

循環器におけるsigma-1受容体の生理機能解明と薬理学的研究

著者	田頭 秀章
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15777号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58771

循環器における sigma-1 受容体の
生理機能解明と薬理学的研究

東北大学大学院薬学研究科
医療薬科学専攻

田頭 秀章

目次

第一章 緒言	3
第二章 心疾患における σ -1 受容体の動態	5
2-1. 序論	
2-2. 実験結果	
2-3. 考察	
2-4. 小括	
第三章 心筋細胞における σ -1 受容体の機能的役割	55
2-1. 序論	
2-2. 実験結果	
2-3. 考察	
2-4. 小括	
第四章 総括	89
第五章 実験方法	94
謝辞	104
参考文献	105

第一章 緒言

日本における死亡要因の三大疾患として、悪性腫瘍、脳梗塞、そして心疾患が挙げられる。特に、慢性心不全患者数は 100 万を超えると推定され、高齢化に伴いその数は増加している。心不全患者の予後は悪く、QOL の改善や医療費削減の観点から、より優れた治療薬の開発が求められる。高血圧や動脈硬化により、負荷が心臓にかかるとその代償機構として、ポンプ機能を維持しようとして心拍数は上昇し、心筋の肥大を起こす。初期の心肥大は、負荷に適応するための代償機構として考えられているが、負荷が持続するとやがては心不全へと移行する。このことから、心不全の前段階で生じる心肥大を抑制することは、心不全の予防・治療につながる。

心肥大は、運動や妊娠などで生じる生理学的心肥大と、高血圧や虚血により生じる病的な心肥大の二つに分類されている。どちらも負荷によって肥大が誘発されるが、病的な心肥大だけが時間の経過により心機能の低下、心不全へと移行する。病的な心肥大の発症には、カテコラミンやアンジオテンシン II (Ang II)、エンドセリン-1 などの神経体液性因子が関与し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加と、それに伴う Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII)、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼ (カルシニューリン) が活性化により、心肥大が誘導される (Nakayama et al., 2010)。

一方、うつ病患者において心疾患死亡率や心疾患発症リスクが増加するという報告がある (Forrester et al., 1992; Schleifer et al., 1989; Frasure-Smith et al., 1993)。うつ病患者の約 20 % は、近年に心筋梗塞にかかった人であるという報告もある (Schleifer et al., 1989)。このような背景の中、selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) などの抗うつ薬の適応により、心疾患合併リスクを減少させるという臨床試験の報告がなされた (Taylor et al., 2005)。同様の SSRI の心臓保護効果の臨床報告は多いが、SSRI による心機能改善作用のメカニズムは不明である。本研究では、SSRI である sertraline (Schmidt et al., 1989) や fluvoxamine (Ishikawa et al., 2007) が高親和性 sigma-1 受容体アゴニストであることに着目した。本論文

では、SSRI である fluvoxamine は sigma-1 受容体を介して心筋保護作用を示すという仮説を立て、病的心肥大モデルである transverse aortic constriction (TAC) モデルマウスと卵巣摘出圧負荷モデル (OVX-PO モデル) ラットを用い、SSRI による心機能改善効果のメカニズムについて明らかにする。

第二章

-心疾患における sigma-1 受容体の動態-

2-1. 序論

Sigma 受容体は、オピオイド受容体サブタイプとして同定されたが、その後の研究により鎮痛効果には直接関与しないことが判明し、現在では内因性リガンドが不明なオーファン受容体として分類されている。Sigma 受容体には sigma-1 受容体と sigma-2 受容体が存在する。Sigma-2 受容体についてはクローニングされておらず、局在や役割など明らかにされていないのに対し、sigma-1 受容体は、非心筋細胞において、mitochondria-associated ER membrane (MAM) に多く発現し、一部は IP₃ 受容体と結合していることが近年明らかにされた (Fig. 1) (Hayashi et al., 2007)。

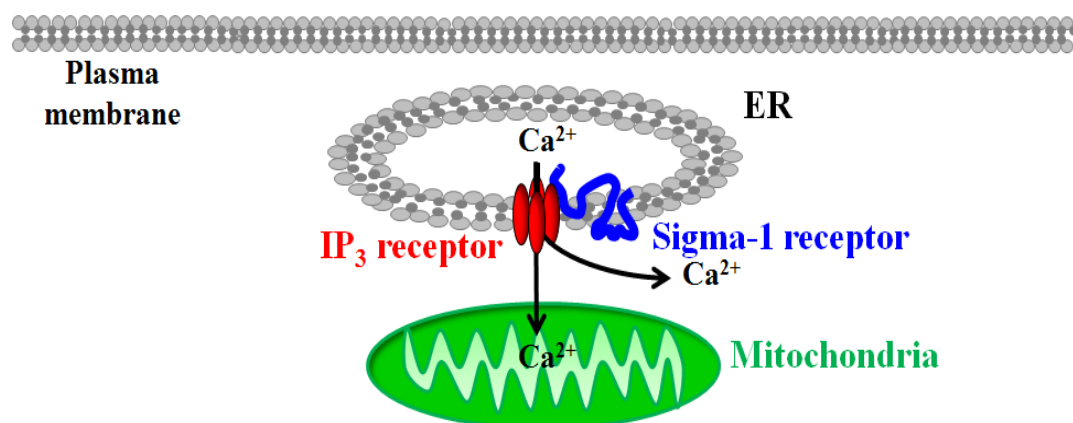


Fig. 1. The localization of sigma-1 receptor in non-cardiac cells.

Sigma-1 受容体は、分子量 27 kDa のタンパク質であり、細胞膜における 2 回膜貫通型受容体である。しかし、その臓器分布は不明である。私達を含むいくつかのグループが、腎臓 (Bhuiyan et al., 2010)、血管 (Bhuiyan et al., 2011a; Bhuiyan et al., 2011b)、ラット培養心筋細胞

(Ela et al., 1994; Novakova et al., 1995; Tagashira et al., 2010) に発現していることを明らかにした。また、培養心筋細胞において、sigma-1 受容体リガンドにより、 Ca^{2+} の流入やその収縮を惹起する(Ela et al.,1996; Novakova et al., 1998)。しかしながら、これまでの研究では、培養あるいは単離心筋細胞を用いて行った実験であり (Ela et al., 1994; Ela et al., 1996; Fialova et al., 2009; Novakova et al., 2007; Novakova et al., 1995)、心肥大・心機能障害などの病態での sigma-1 受容体の役割については不明である。本論文では、最初に、病的な心肥大における sigma-1 受容体の動態を明らかにする (Tagashira et al., 2010)。次に、心筋細胞における sigma-1 受容体の役割を明らかにする。最後に、創薬ターゲットとしての sigma-1 受容体の有用性についても明らかにする。Fig. 2 には本研究で用いた Sigma-1 受容体アゴニストとアンタゴニストの構造を示した。SSRI である fluvoxamine ($K_i = 36\text{nM}$)、鎮痛補助薬である pentazocine ($K_i = 2.1\text{nM}$)、sigma-1 受容体選択的アゴニストである SA4503 ($K_i = 4.6\text{nM}$)は高親和性アゴニストであり、ステロイド骨格を有する老化抑制ホルモンの dehydroepiandrosterone (DHEA) ($K_i = 706\text{nM}$)は低親和性アゴニストである。選択的 sigma-1 受容体アンタゴニストとしては NE-100 ($K_i = 0.86\text{nM}$) を用いた。SA4503 は、Matsuno ら (1996)、Tanaka ら (1995) により他のチャネルや受容体において親和性を示さないことが証明されている。またセロトニンに関して、NE-100 はセロトニン受容体 ($\text{IC}_{50} > 1\text{ }\mu\text{M}$ (rat))、セロトニントランスポーター ($K_i > 10\text{ }\mu\text{M}$ (rat))に親和性を示さないことが報告されている (Okuyama et al., 1993)。

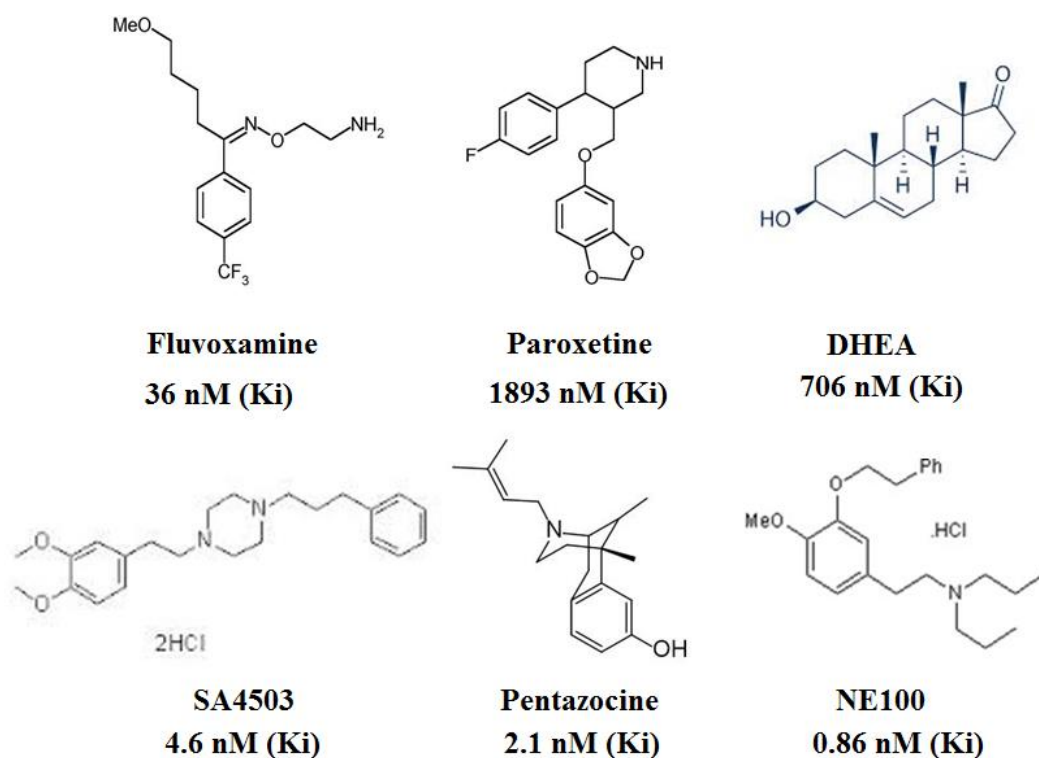


Fig. 2. The structure and affinity of sigma-1 receptor ligands.

We show the structure and affinity of sigma-1 receptor ligand that used in this study. Fluvoxamine, DHEA, SA4503 and pentazocine are sigma-1 receptor agonists, whereas NE-100 is selective sigma-1 receptor antagonist.

また動物実験モデルとしては TAC モデルマウスと卵巣摘出圧負荷モデル (OVX-PO モデル)を用いた。TAC モデルマウスは、動脈硬化好発部位として知られる横行大動脈を狭窄し、心臓に圧負荷をかけるというモデルである。このモデルにおいて、TAC を行って 2 週間後から代償機構としての心肥大が起こり始め、4 週間後には心肥大は悪化し、心機能障害が見られる。このことから、TAC を行って 4 週間後には心肥大から心不全への移行期間にさしかかっていると考えられ、ヒトの病態に近いモデルとして頻用されている。OVX-PO モデルは、左右の卵巣摘出 (OVX) 後 2 週間後に、動脈硬化好発部位として知られる腹部大動脈 (左右腎動脈分岐点) を狭窄 (PO) し、心臓および心臓直下の胸部大動脈に負荷をかけるというモデルである。このモデルにおいて、PO を行って 2 週間後から代償機構としての心肥大が起こり始め、4 週間後には心肥大は悪化し、心機能障害が見られる。ヒトの閉経後

心疾患のモデルとして有用なものは現在ほとんどなく、このモデルは当研究室が開発したオリジナルモデルであり、ヒトの閉経後心疾患のモデルとして有用である(Bhuiyan et al., 2007)。

2-2. 実験結果

2-2-1. TAC マウス心臓における心肥大・心機能障害と sigma-1 受容体の発現量の経時的変化

最初に、TACにより引き起こされる心肥大及び心機能障害と、左心室における sigma-1 受容体の発現量が経時的にどのように変化するのか検討した。心機能障害の指標として用いられている fractional shortening (FS) は TAC を行ってから 4 週間後において有意に低下した ($P < 0.01$ vs sham 群, Fig. 3A, B)。一方、心肥大を heart weight / body weight (HW/BW) で、肺の肥大を lung weight / body weight (LW/BW) で評価すると、HW/BW 及び LW/BW は TAC 処置の 2 週間後から有意な上昇 ($P < 0.05$ vs sham 群) が見られ、4 週、6 週間後では更に上昇した ($P < 0.01$ vs sham 群, Fig. 4C, D)。面白いことに、sigma-1 受容体の発現量は、心機能が低下し始める 4 週間後から有意に低下し、6 週間後には sham 群と比較して約 30% までに低下した ($P < 0.01$ vs sham 群, Fig. 3E)。これらのことから、心機能障害に伴い sigma-1 受容体の発現量が低下するということがわかった。

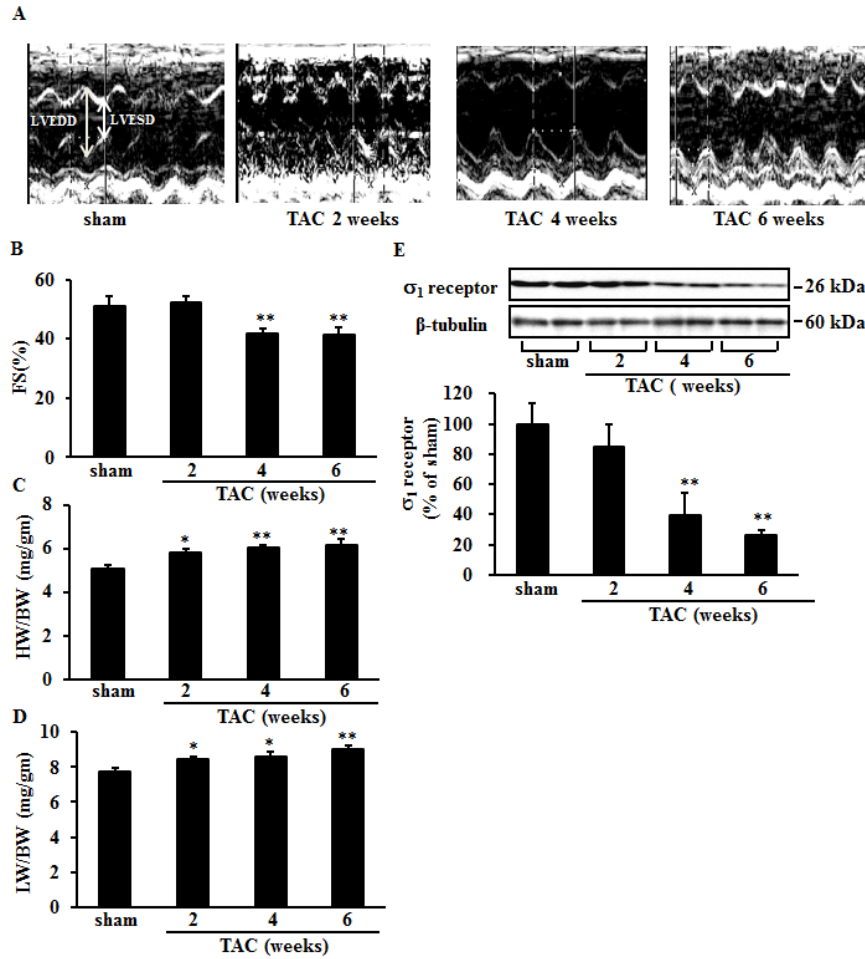


Fig. 3. Temporal changes in heart function and sigma-1 receptor levels following TAC in mice.

A, Representative M-mode echocardiograms of mice before and after 2-6 weeks of TAC. LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter; LVESD: left ventricular end-systolic diameter. B, Changes in percentage of LV fraction shortening (FS%). TAC-induced myocardial hypertrophy indicated by heart weight to body weight ratio (HW/BW) (C) and by lung weight to body weight ratio (LW/BW) (D). E, Western blot analysis (upper) and densitometry quantification (lower) of Sig-1R expression in the LV. Each group consists of 5-10 mice. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody showed equal protein loading in each lane. Data are expressed as percentages of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.) Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group.

2-2-2. TAC により引き起こされる心肥大・心機能障害に対する fluvoxamine, paroxetine の効果

SSRI である fluvoxamine 及び paroxetine の心筋保護効果について検討した。TAC 後 1 日目から、fluvoxamine、paroxetine 及び sigma-1 受容体の選択的アンタゴニストである NE100 を 4 週間連続経口投与した。TAC (vehicle) 群において、有意な心機能の低下が認められた ($P < 0.01$ vs sham 群; Fig. 4A, B; Fig. 6A, B)。Fluvoxamine (0.5, 1.0 mg/kg) を慢性投与すると、用量依存的に FS を改善した ($P < 0.01$ vs TAC 群; Fig. 5B)。一方、paroxetine 投与群では FS の改善作用は認められなかった (Fig. 4B)。NE100 を同時投与群では、fluvoxamine による心機能改善作用は完全に消失した ($P < 0.01$ vs TAC+Flux1.0 群; Fig. 4B)。これらの事から、fluvoxamine による心機能改善作用は sigma-1 受容体を介していると考えられる。

Fluvoxamine 投与群では、用量依存的に HW/BW の上昇を抑制し ($P < 0.01$ vs TAC 群; Fig. 4C)、LW/BW の上昇も抑制した ($P < 0.05$ vs TAC 群; Fig. 4 C)。一方、paroxetine 投与群においては HW/BW 及び LW/BW の上昇抑制作用は認められなかった (Fig. 6C, D)。さらに、NE100 同時投与群では、fluvoxamine による HW/BW 及び LW/BW の増加抑制作用は消失した ($P < 0.01$ vs TAC+Flux1.0 群; Fig. 4C, D)。これらの事から、fluvoxamine は sigma-1 受容体を介して心肥大を抑制すると考えられる。一方、sham 群に fluvoxamine、NE100 を投与した群では、心機能、HW/BW、LW/BW に変化は見られなかった (Fig. 5A-D)。

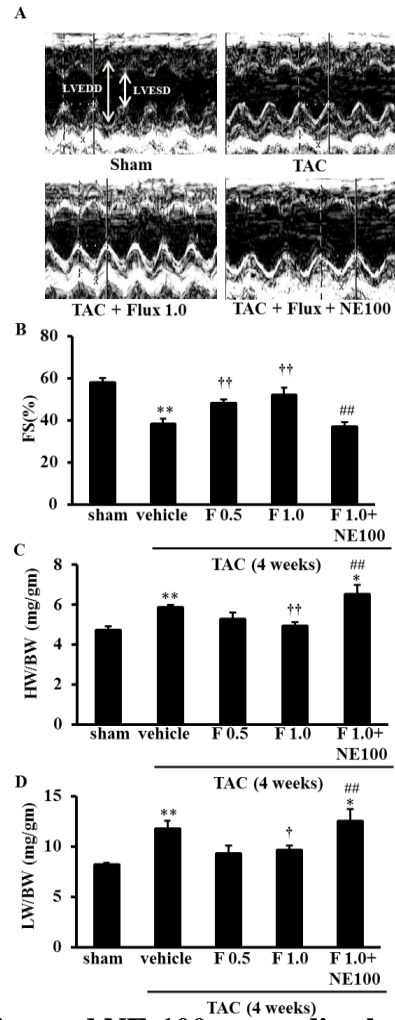


Fig. 4. Effect of fluvoxamine and NE-100 on cardiac hypertrophy and failure induced by TAC in mice.

A, Representative M-mode echocardiograms of mice with and without fluvoxamine (Flux, F) and/or NE-100 treatments. B, Changes in percentage of LV fractional shortening (FS %). TAC mice were treated with fluvoxamine 0.5 (F 0.5) or 1.0 mg/kg (F 1.0), or fluvoxamine (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg) as indicated. TAC-induced myocardial hypertrophy indicated by HW/BW (C) and LW/BW (D) ratio. Each group consists of 5-10 mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. **, $P < 0.01$ versus sham group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the TAC-vehicle treated group; ##, $P < 0.01$ versus the TAC plus fluvoxamine 1 mg/kg treated group.

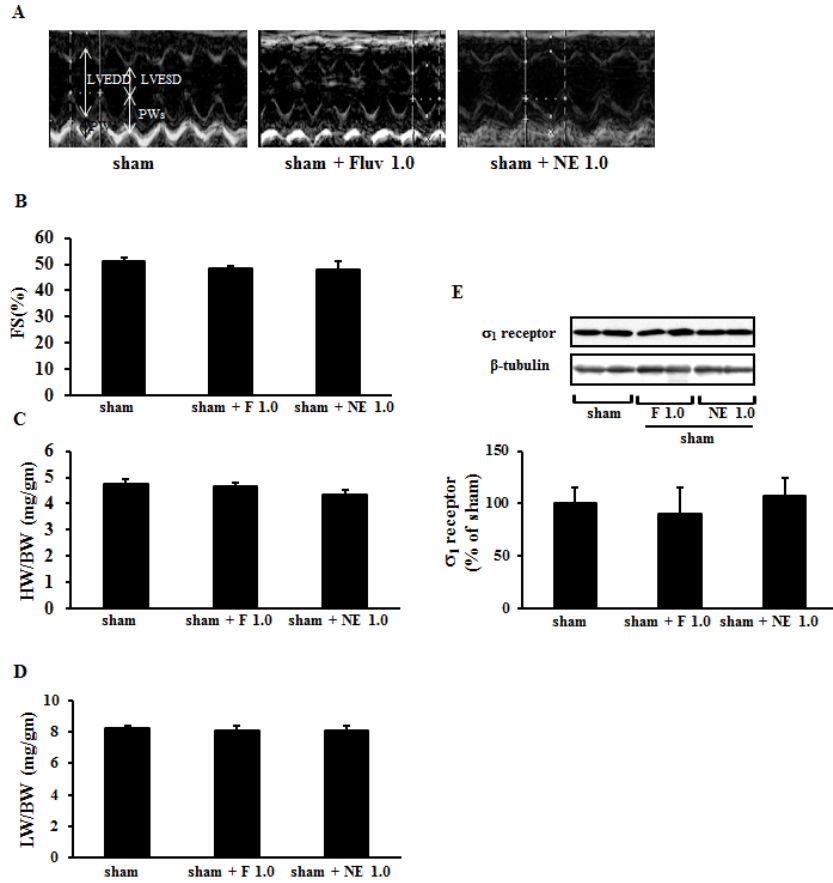


Fig. 5. Effect of fluvoxamine and NE-100 on sham mice.

A, Representative M-mode echocardiograms of mice treated with fluvoxamine and NE-100 during 4 weeks. B, Percentage of LV fraction shortening (LV%FS). HW-to-BW ratio (C) and LW-to-BW ratio (D). E, Western blot analysis and densitometry quantification of Sig-1R expression in the LV. Each group consists of 5-10 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M.

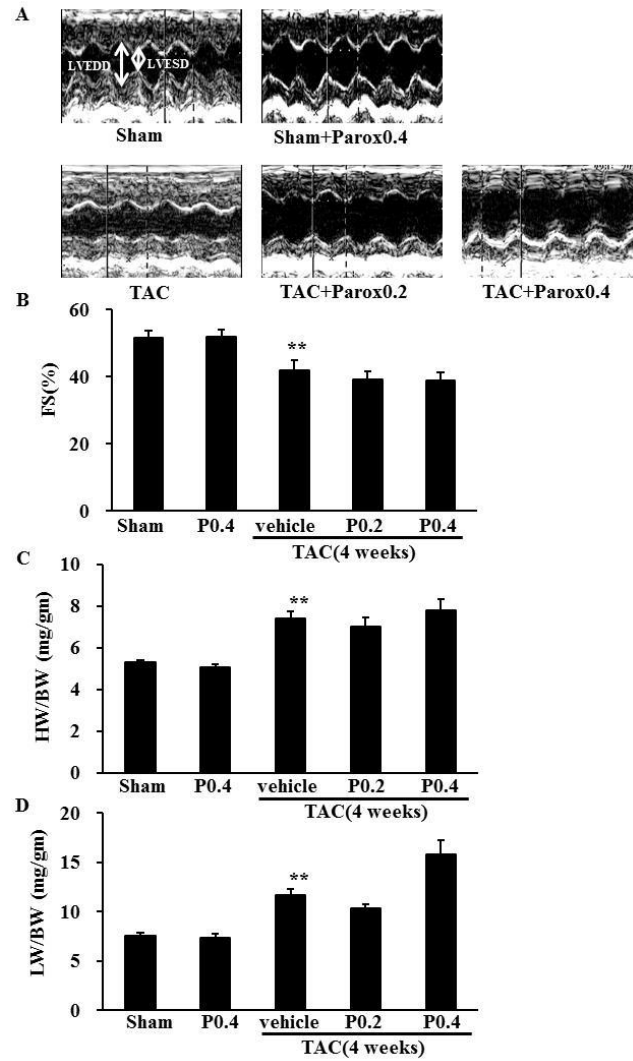


Fig. 6. Effect of paroxetine on cardiac hypertrophy and failure induced by TAC in mice.

A, Representative M-mode echocardiograms of mice with and without drug (Parox) treatments. B, Changes in percentage of LV fractional shortening (FS%). TAC or sham mice were treated with paroxetine 0.2 or 0.4mg/kg as indicated. TAC-induced myocardial hypertrophy indicated by HW/BW (C) and LW/BW (D) ratio. Each group consists of 4-5 mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. **, $P < 0.01$ versus sham group.

2-2-3. Sigma-1 受容体発現量に対する fluvoxamine の効果

Fluvoxamine 投与により、TAC による心肥大及び心機能障害が改善することから、sigma-1 受容体発現に対する fluvoxamine の効果を検討した。TAC により sigma-1 受容体の発現量は有意に減少し($P < 0.01$ vs sham 群, Fig. 7A, B)、fluvoxamine 投与により、用量依存的に sigma-1 受容体の発現は回復した ($P < 0.01$ vs TAC 群, Fig. 7A, B)。一方、paroxetine 投与群では、sigma-1 受容体の発現は改善しなかった (Fig. 7C, D)。NE100 同時投与により、fluvoxamine による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかった (Fig. 7A, B)。また、sham 群に fluvoxamine、NE100 を投与した群においては、変化がみられなかった (Fig. 5E)。これらの事から、fluvoxamine による sigma-1 受容体の発現調節作用には、sigma-1 受容体が直接関与しないと考えられる。

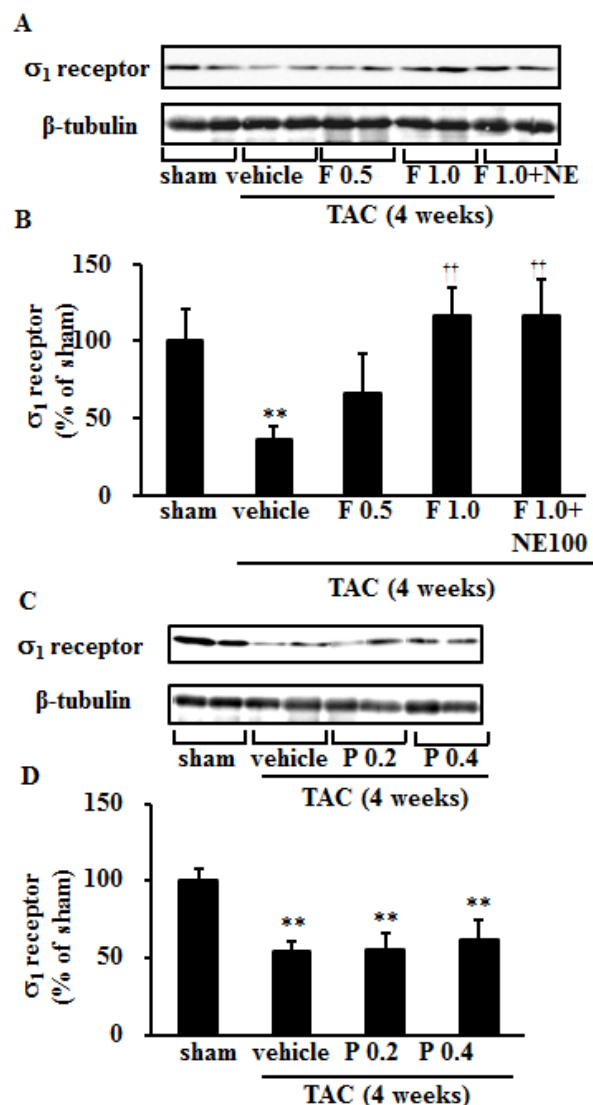


Fig. 7. Effects of fluvoxamine, paroxetine and NE-100 on Sig-1R expression.

A. Western blot analysis of Sig-1R expression and β -tubulin as a loading control in the LV of sham and TAC-mice with or without fluvoxamine and NE-100 treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody showed equal protein loading in each lane. B. Densitometric quantification of Sig-1R immunoreactive bands. C. Western blot analysis of Sig-1R expression and β -tubulin as a loading control in the LV of sham and TAC-mice with or without paroxetine treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody showed equal protein loading in each lane. D. Densitometric quantification of Sig-1R immunoreactive bands. Data are expressed as percentages of values of sham-operated mice (mean \pm S.E.M). Each group consists of 5-10 mice. **, Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. $P < 0.01$ versus sham group; ^{††}, $P < 0.01$ versus the TAC-vehicle treated group.

2-2-4. Sigma-1 受容体刺激による Akt 活性化作用

私達は、卵巣を摘出した雌性ラットにおいて、圧負荷による病的心肥大及びそれに伴う心機能障害の際、ラット左心室心筋細胞において、protein kinase B (Akt) のリン酸化レベルが有意に低下する事を以前報告した (Bhuiyan et al., 2007; Bhuiyan et al., 2009b; Bhuiyan and Tagashira et al., 2010)。そこで、fluvoxamine の心機能改善作用は Akt の活性化作用が関与すると予測した。Akt の活性化には、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 活性化に伴う Akt の Ser 473 及び Thr 308 のリン酸化が必須である。圧負荷による病的心肥大及び心機能障害の際、マウス左心室心筋細胞において、Akt の Ser 473 ($P < 0.01$ vs Sham 群) 及び Thr308 ($P < 0.01$ vs Sham 群) のリン酸化反応が低下し、fluvoxamine 投与により、Ser473 ($P < 0.01$ vs TAC 群) 及び Thr308 ($P < 0.01$ vs TAC 群)リン酸化反応 が上昇した (Fig. 8A-C)。NE100 同時投与で、fluvoxamine による Akt のリン酸化上昇が阻害された (Fig. 8A-C)。これらの事から、sigma-1 受容体を介する fluvoxamine の心筋保護効果は Akt の活性上昇と相関する事が示された。

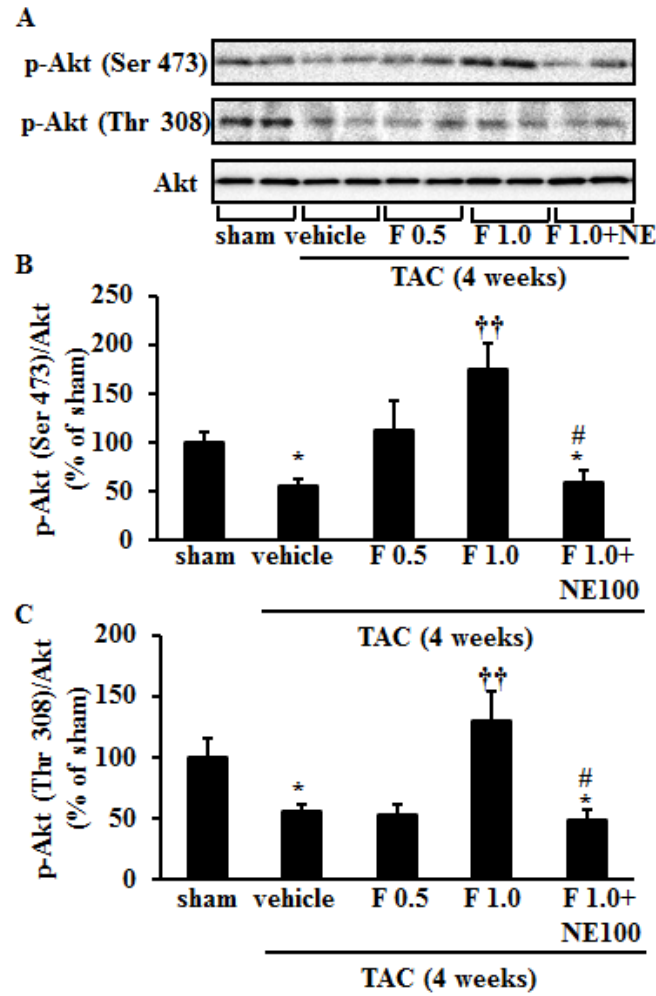


Fig. 8. Effects of fluvoxamine and NE-100 on Akt phosphorylation.

Western blot analysis (A) and densitometric quantification of phospho-Akt (Ser-473) (B) and phospho-Akt (Thr-308) (C) in the LV of TAC-mice with or without drug treatment. Data are expressed as percentages of the value of sham mice. Densitometric quantification of phospho-Akt (Ser-473) (B) and phospho-Akt (Thr-308) (C) was relative to total Akt in the LV. Each group consists of 5-10 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. *, $P < 0.05$ versus the sham group; †, $P < 0.01$ versus the TAC-vehicle treated group; #, $P < 0.05$ versus the TAC plus fluvoxamine 1 mg/kg (F 1.0) treated group.

2-2-5. Sigma-1 受容体刺激による eNOS の発現量、及び eNOS のリン酸化反応の変化

ヒト血管内皮細胞では eNOS が Akt の基質である (Haynes et al., 2000; Zeng et al., 2000)。私達は、卵巣を摘出した雌性ラットにおいて、圧負荷による心機能障害に伴い、ラット左心室心筋細胞において、eNOS の発現量、及びリン酸化レベルが低下する事を明らかにした (Bhuiyan et al., 2007; Bhuiyan et al., 2009b; Bhuiyan and Tagashira et al., 2010)。これらの報告に一致して、TAC による心機能障害に伴い、マウス左心室心筋細胞における eNOS の発現量は有意に減少した ($P < 0.05$ vs Sham 群; Fig. 9A, B)。さらに Akt による eNOS の Ser1177 リン酸化が有意に減少した ($P < 0.05$ vs Sham 群; Fig. 9A, C)。Fluvoxamine 投与は、eNOS の発現量 ($P < 0.01$ vs TAC 群 Fig. 9A, B)、及び eNOS の Ser1177 リン酸化 ($P < 0.05$ F 0.5, $P < 0.01$ F 1.0 vs TAC 群; Fig. 10A, B) を有意に上昇させた。NE100 投与により、fluvoxamine による eNOS の発現量の増加は消失した ($P < 0.05$ vs TAC+Flux1.0 群)。同様に、eNOS の Ser1177 リン酸化レベルの有意な上昇作用も NE100 投与により消失した ($P < 0.01$ vs TAC + Flux 1.0 群; Fig. 9A, C)。eNOS の Ser1177 リン酸化を eNOS のタンパク質量で補正した場合にも、リン酸化量は上昇したことから (Fig. 7D)、fluvoxamine による sigma-1 受容体刺激により、Akt による eNOS のリン酸化レベルが上昇するということが明らかとなった。

心筋細胞において、eNOS 活性は HSP90 やカベオラにおける足場タンパク質 caveolin-3 により調節されている (Fulton et al., 2001)。eNOS の発現が TAC により減少したことから、HSP90 や caveolin-3 の発現量についての検討も行った。しかし、HSP90 (Fig. 9E) 及び caveolin-3 (Fig. 9F) において発現量には変化が見られなかった。心筋細胞のカベオラにおいて、fluvoxamine 投与により、eNOS 足場タンパク質の発現に影響する事なしに、sigma-1 受容体刺激は eNOS のリン酸化反応を亢進すると考えられる。

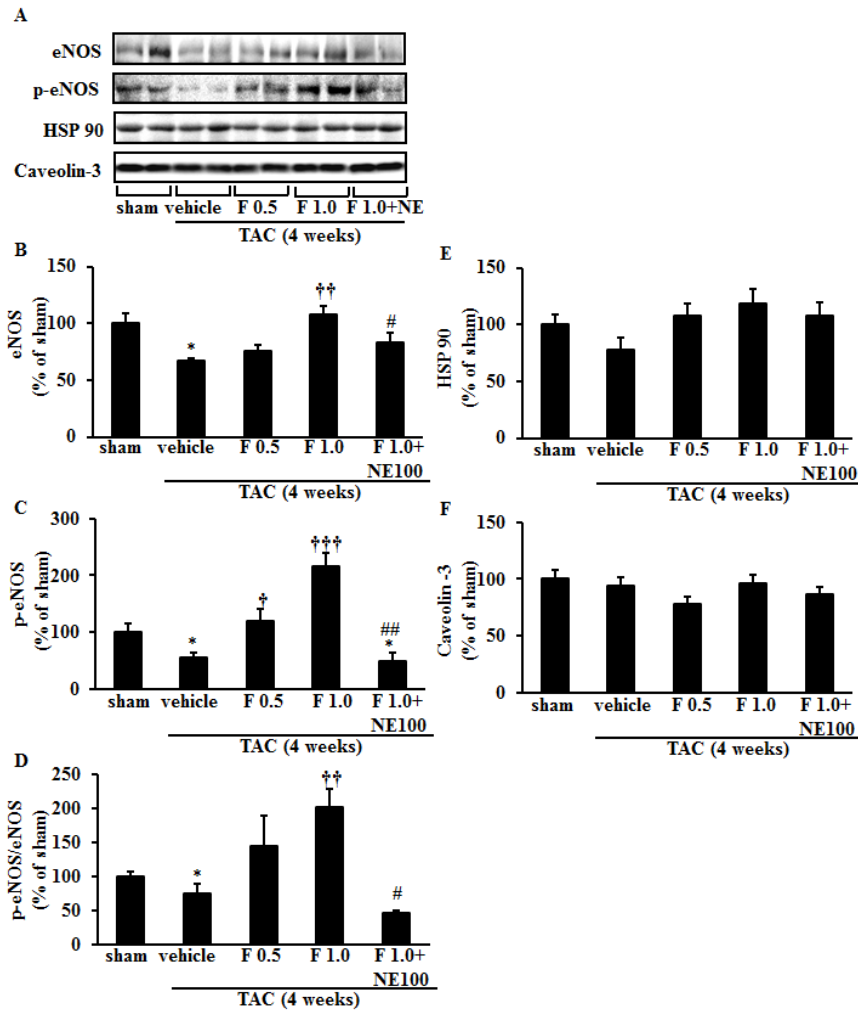


Fig. 9. Effects of fluvoxamine and NE-100 on levels of eNOS, eNOS phosphorylation, HSP 90 and caveolin-3.

Western blot analysis (A) and densitometric quantification of eNOS (B), phospho-eNOS (Ser-1179) (C), ratio of phospho-eNOS to eNOS (D), HSP 90 (E) and caveolin-3 (F) in the LV of TAC mice with or without drug treatment. Data are expressed as percentages of the value of sham mice. Each group consists of 5-10 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. *, $P < 0.05$ versus the sham group; \dagger , $P < 0.05$, $\dagger\dagger$, $P < 0.01$ and $\dagger\dagger\dagger$, $P < 0.001$ versus the TAC-vehicle treated group; $\#$, $P < 0.05$ and $\#\#$, $P < 0.01$ versus the TAC plus fluvoxamine 1 mg/kg (F 1.0) treated group.

2-2-6. Sigma-1 受容体刺激による ERK1/2、及び PKC α のリン酸化の変化

Fluvoxamine による他のプロテインキナーゼシグナルへの影響を検討する為に、TAC による心機能障害、及び fluvoxamine 投与に伴う、マウス左心室における ERK1/2 のリン酸化反応を検討した。しかし、ERK1/2 のリン酸化レベルには有意な変化は認められなかった (Fig. 10A)。

同様に、TAC による心機能障害、及び fluvoxamine 投与に伴う、PKC α のリン酸化反応を検討した。PKC α は、PKC のアイソフォームの中でも血管内皮細胞において主に発現しており、in vivo 及び in vitro において eNOS の Ser1177 のリン酸化を調節しているプロテインキナーゼである (Carrithers et al., 2005)。さらに、PC12 細胞において sigma-1 受容体アゴニストにより PKC α の活性化反応が起こり、血清欠乏によるアポトーシス条件下において、細胞生存に関わる事が知られている (Charalampopoulos et al., 2004)。しかし、いずれの条件下においても PKC α のリン酸化反応は変化しなかった (Fig. 10B)。

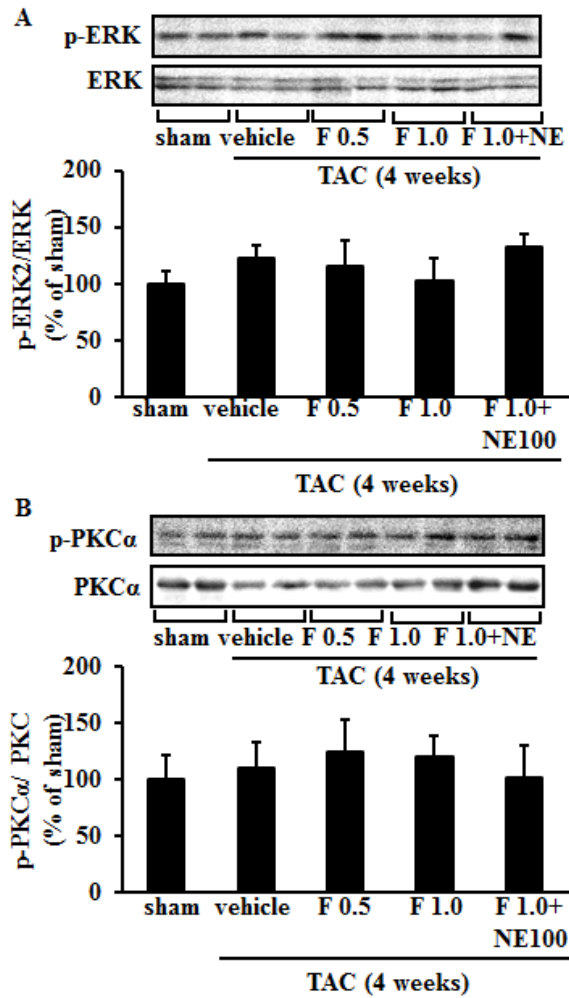


Fig. 10. Effects of fluvoxamine and NE-100 on ERK1/2 and PKC α phosphorylation.

Western blot analysis and densitometric quantification of ERK1/2 phosphorylation

(Thr-202/Tyr-204) (A) and PKC α phosphorylation (Ser-657) (B) relative to respective total proteins in the LV of TAC-mice with or without drug treatment. Data are expressed as percentages of the value of sham mice. Each group consists of 5-10 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M.

2-2-7. TAC により引き起こされる心肥大・心機能障害に対する SA4503 の効果

SSRI である fluvoxamine による sigma-1 受容体を介する心筋保護効果については、SSRI であることから、セロトニンの影響が考えられる。そこで、sigma-1 受容体選択的アゴニストである SA4503 を用い、TAC による心肥大・心機能障害に対する SA4503 の効果について検討した。TAC 後 1 日目から、SA4503 及び sigma-1 受容体の選択的アンタゴニストである NE100 を 4 週間連続経口投与した。TAC (vehicle) 群において、有意な心機能の低下が認められた ($P < 0.01$ vs sham 群, Fig. 11A-C)。SA4503 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) を慢性投与すると、用量依存的に FS および左心室収縮期径 (LVESD) を有意に改善した ($P < 0.01$ vs TAC 群, Fig. 11A-C)。NE100 を同時投与すると、SA4503 による心機能改善作用は完全に消失した ($P < 0.05$ vs TAC+SA1.0 群, Fig. Fig. 11A-C)。これらのことから、SA4503 による心機能改善作用は sigma-1 受容体を介していることが確認できた。同様に、SA4503 投与群では、用量依存的に HW/BW の上昇を抑制し ($P < 0.01$ vs TAC 群, Fig. 11D)、LW/BW の上昇も抑制した ($P < 0.01$ vs TAC 群, Fig. 11E)。さらに、NE100 同時投与では、SA4503 による HW/BW 及び LW/BW の改善作用は消失した ($P < 0.01$ vs TAC+Flux1.0 群, Fig. 11D, E)。

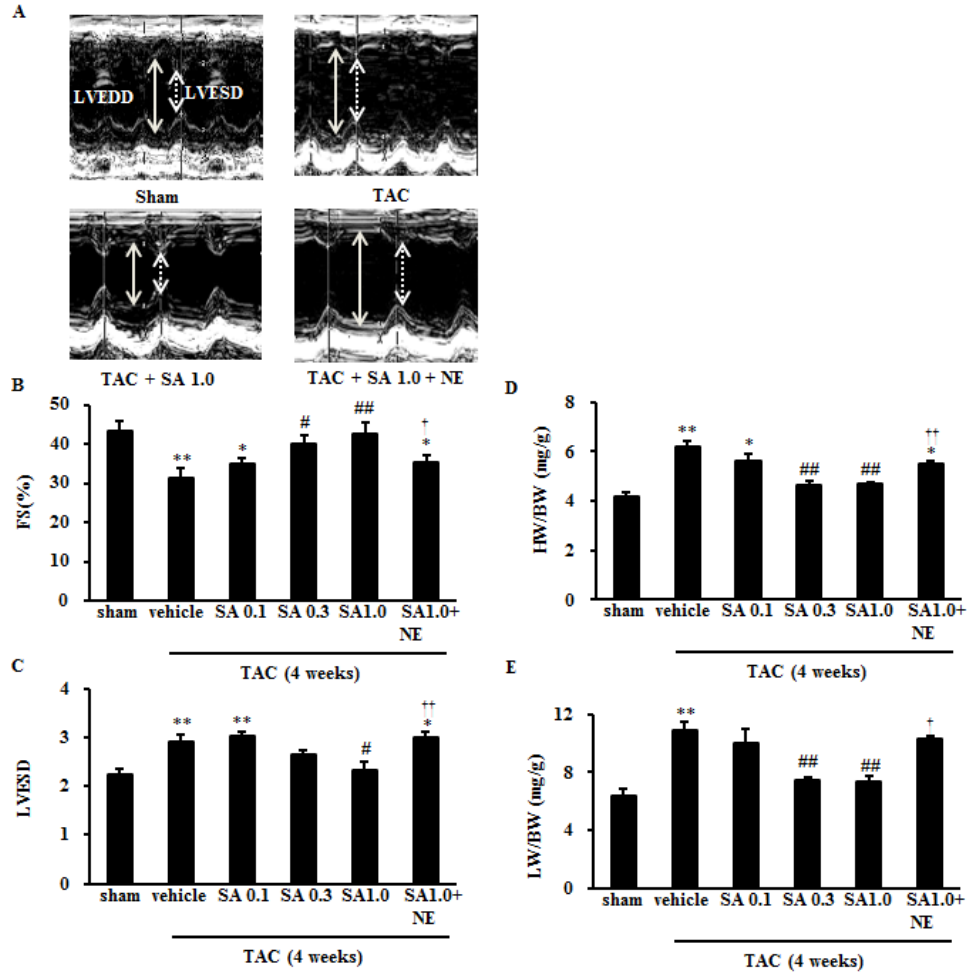


Fig. 11. Effect of SA4503 and NE-100 on cardiac failure and hypertrophy induced by TAC.

A, Representative M-mode echocardiograms of mice with or without SA4503 and/or NE-100 treatments. B, Changes in percentage of LV fractional shortening (FS%). C, Changes of left ventricular end-systolic diameter (LVESD). TAC mice were treated with SA4503 (0.1, 0.5 or 1.0mg/kg) or SA4503 (1.0mg/kg) plus NE-100 (1.0mg/kg) as indicated. D, TAC-induced cardiac hypertrophy as indicated by the heart weight/body weight (HW/BW) ratio. E, TAC-induced cardiac hypertrophy as indicated by the lung weight/body weight (LW/BW) ratio. Each group consists of 4-5 mice. Data are expressed as percentages of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.) *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus SA4503 (1 mg/kg)-treated group.

2-2-8. Sigma-1 受容体、IP₃ 受容体発現量、および ATP 産生に対する SA4503 の効果

SA4503 投与により、TAC による心肥大・心機能障害が改善されたことから、sigma-1 受容体発現に対する SA4503 の効果について検討した。TAC により sigma-1 受容体の発現量は有意に減少し ($P < 0.01$ vs sham 群; Fig. 12A, B)、SA4503 投与により、用量依存的に sigma-1 受容体の発現量は有意に回復した ($P < 0.01$ vs TAC 群; Fig. 13A, B)。NE100 同時投与群では、SA4503 による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかった (Fig. 12A, B)。

次に、sigma-1 受容体と結合する IP₃ 受容体の発現量について検討した。TAC により IP₃ 受容体の発現量は有意に増加した ($P < 0.01$ vs sham 群; Fig. 12A, C)。SA4503 投与は、用量依存的に IP₃ 受容体の発現増加を有意に抑制し ($P < 0.01$ vs TAC 群; Fig. 13A, C)、NE100 同時投与は、SA4503 による IP₃ 受容体の発現増加抑制を消失させた ($P < 0.01$ vs TAC+SA4503 群; Fig. 12A, C)。

これまでに IP₃ 受容体は小胞体 (ER) からミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を担っていること (Cárdenas et al., 2010)、ミトコンドリアの Ca²⁺ 上昇は TCA 回路を活性化すること (Donton et al., 1972; McCormack et al., 1979)、そして sigma-1 受容体は IP₃ 受容体と会合し、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進することが知られている (Hayashi et al., 2007)。そこで次に ATP 産生について検討した。TAC により ATP 産生は有意に減少した ($P < 0.01$ vs sham 群; Fig. 12D)。SA4503 投与は、用量依存的に ATP 産生を有意に亢進し ($P < 0.01$ vs TAC 群; Fig. 12D)、NE100 同時投与は、SA4503 による ATP 産生増加作用を消失させた ($P < 0.01$ vs TAC+SA4503 群; Fig. 12D)。これらのことから、SA4503 は、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を亢進し、心筋保護作用を示すことが予想された。

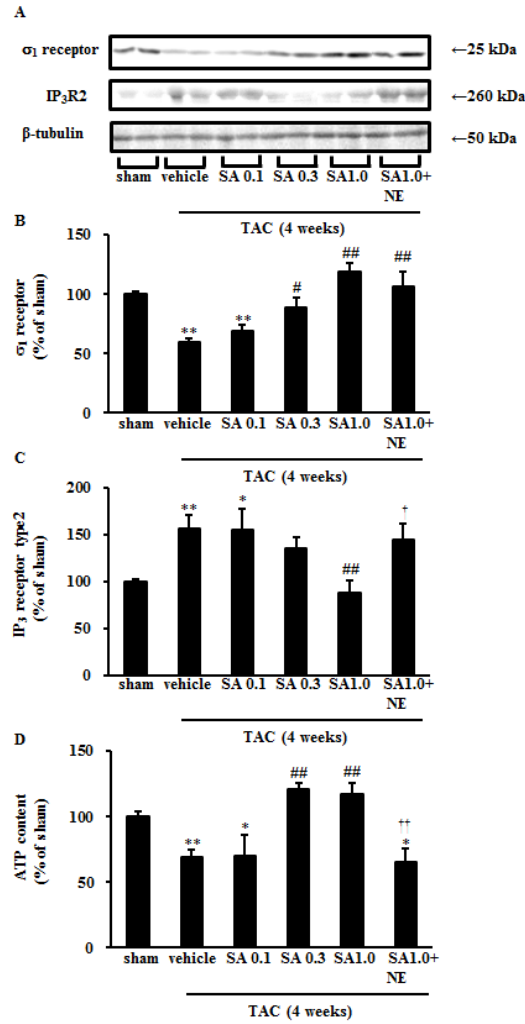


Fig. 12. Effects of SA4503 and NE-100 on σ_1 R and IP₃R2 expression and ATP content in TAC mice.

A. Western blot analysis of σ_1 R, IP₃R2 and β -tubulin (as a loading control) expression in the LV of sham and TAC-mice with or without drug treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading in each lane. B, Densitometric quantification of σ_1 R immunoreactive bands. C, Densitometric quantification of IP₃R2 immunoreactive bands. D, Measurement of cellular ATP content in the LV of TAC mice with or without drug treatment. Each group consists of 4-5 mice. Data are expressed as percentages of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.) *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle-treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus SA4503 (1 mg/kg)-treated group.

2-2-9. ATP 産生に対する fluvoxamine の効果

Fig. 12D より、SA4503 は、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を増強する結果、心筋保護作用を示すことから、次に、SSRI である fluvoxamine について検討した。SA4503 と同様、TAC により有意に減少した ATP 産生量は、fluvoxamine 投与により、用量依存的に ATP 産生は上昇し ($P < 0.05$ vs TAC 群; Fig. 13)、NE100 同時投与により、fluvoxamine による ATP 産生上昇は消失した ($P < 0.05$ vs TAC+Flux 群; Fig. 14)。

次に、IP₃ 受容体を介した ATP 産生量を検討するため、IP₃ 産生を刺激する α_1 受容体アゴニスト、フェニレフリン (PE) 刺激による ATP 産生量について検討した。PE 処置後 30 分後に ATP 産生は約 150%まで上昇した。PE 依存性の ATP 産生は TAC 群においてはほとんど見られなくなる (Fig 13)。fluvoxamine 投与により、PE 刺激による ATP 産生はほぼ完全に回復した。NE100 同時投与は fluvoxamine による ATP 産生改善作用は、完全に消失した (Fig 13)。これらのことから SA4503 同様に、fluvoxamine も、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介してミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を増強すると考えられる。

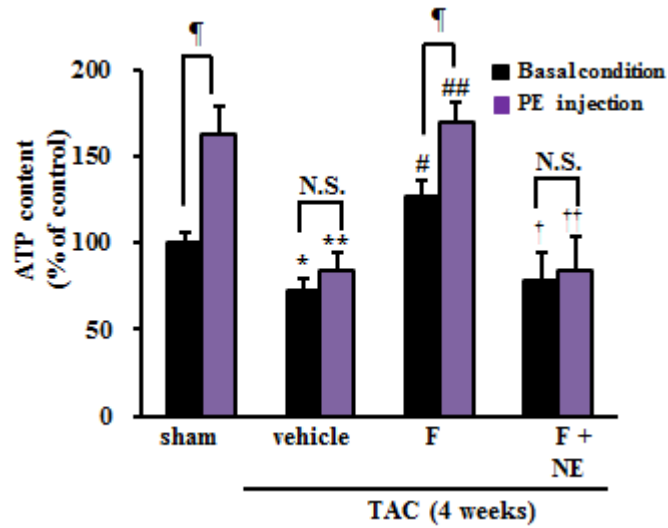


Fig. 13. Effects of fluvoxamine and NE-100 on ATP content in TAC mice.

Cellular ATP content in the LV with or without injection of PE into TAC-mice with or without drug treatment (n=4). Data are expressed as percentages of the value of sham mice (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus fluvoxamine (F) (1 mg/kg)-treated group; ¶, $P < 0.05$ versus the non-stimulated group.

2-2-10. OVX-PO による心肥大・心機能障害に対する DHEA およびエストロゲンの効果

これまでの検討は全て TAC による心肥大・心機能障害に対する sigma-1 受容体を介した心筋保護効果についての検討である。次に、他の病的な心肥大モデル(OVX-PO)においても同様に、sigma-1 受容体アゴニストが心筋保護効果を示すか検討した。また、sigma-1 受容体アゴニストとしてステロイドであり、老化抑制ホルモンとして知られる DHEA を、また同じくステロイドであるが、sigma-1 受容体に親和性を持たないエストロゲン (E2) を用いて比較検討した。

卵巣摘出後 2 週間後に腹部大動脈を 27G ニードルで狭窄し、狭窄後 1 日目から、DHEA (30 mg/kg, p.o.), E2 (0.1 mg/kg/day, osmotic pump) 及び sigma-1 受容体の選択的アンタゴニストである NE100 (1.0 mg/kg, p.o.)を 4 週間連続経口投与した。最初に、左心室の拡張期最小圧 (LVEDP)、左心室拡張期圧 (LVDP)、左心室収縮速度 ($\pm dp/dt$)、抹消血圧 (MABP)、そして心拍数 (HR) について検討した。OVX-PO (vehicle) 群において、いずれのパラメーターにおいても有意な心機能の低下が認められた ($P < 0.01$ vs OVX 群; Fig. 14A-F)。また、DHEA, E2 を慢性投与すると、血行動態を指標にした心機能障害を改善した ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 14A-F)。NE100 を同時投与では、DHEA による心機能改善作用は完全に消失した ($P < 0.01$ vs OVX-PO+DHEA 群; Fig. 14A-F)のに対し、E2 投与群では消失しなかった (Fig. 14A-F)。これらのことから、DHEA による心機能改善作用は sigma-1 受容体を介し、E2 による心機能改善作用は sigma-1 受容体を介さない事が示された。

同様に、DHEA, E2 投与群では、どちらも HW/BW の上昇を抑制し ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 15A)、LW/BW の上昇も抑制した ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 15B)。また、心機能障害と同様に、DHEA による HW/BW, LW/BW の増加抑制作用は消失した ($P < 0.05$ vs OVX-PO+DHEA 群; Fig. 15A, B) のに対し、E2 投与群では消失しなかった (Fig. 15A, B)。これらのことから、DHEA による心肥大改善作用もまた sigma-1 受容体を介する事が明らかとなった。

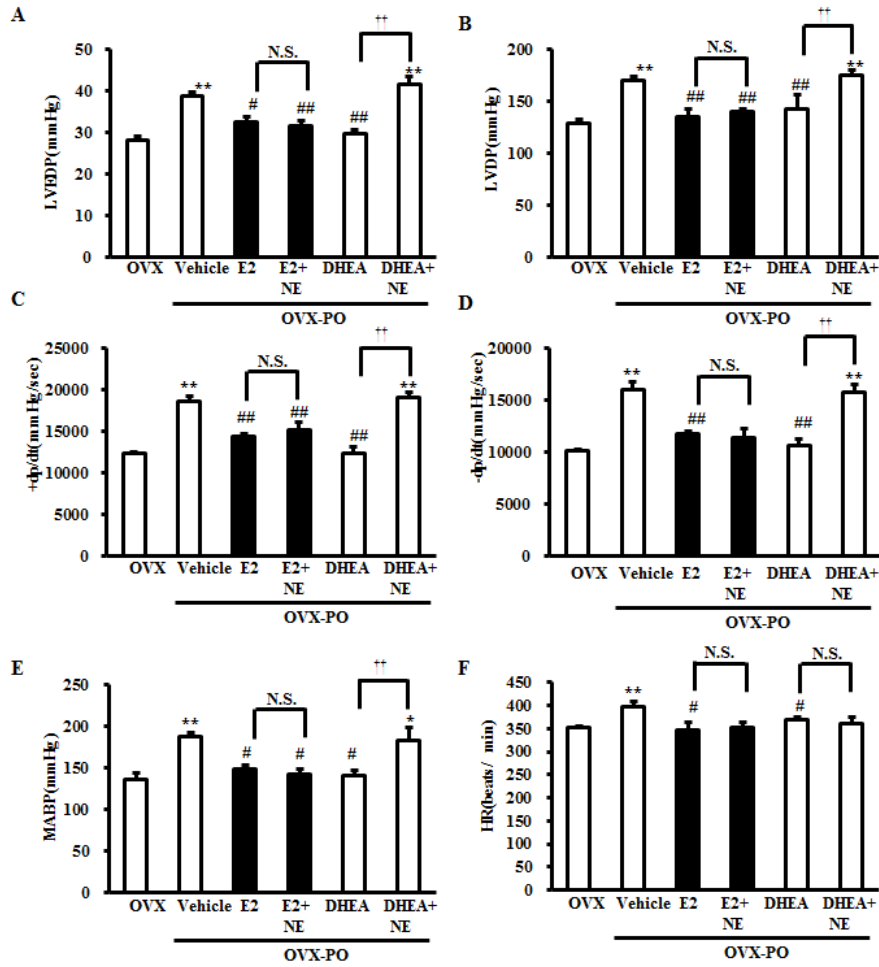


Fig. 14. Effect of E2, DHEA and NE-100 (NE) on hemodynamic measurements.

A: Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP). B: Left ventricular developed pressure (LVDP). C: Rates of left ventricular contraction (+dp/dt). D: Rates of left ventricular relaxation (-dp/dt). E: Mean arterial blood pressure (MABP). F: Heart rate (HR). Each column represents the mean \pm S.E.M. **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group. ††, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-DHEA treated group. The number of rats utilized in this experiment is indicated on each column.

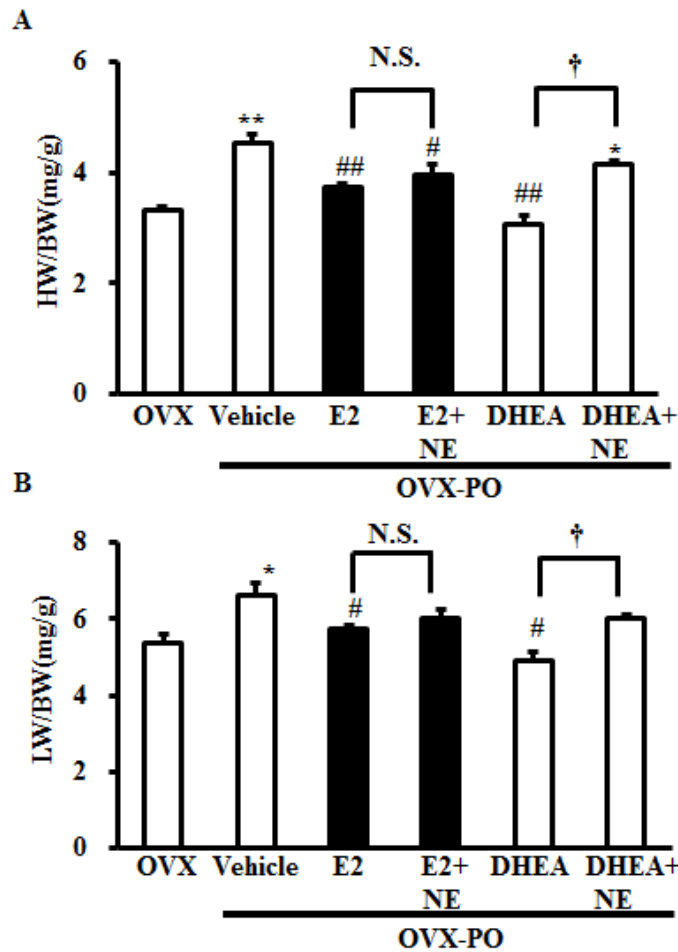


Fig. 15. Effect of E2, DHEA and NE-100 (NE) on cardiac hypertrophy induced by pressure overload in ovariectomized female rats.

A: Effect of E2 on pressure overload-induced myocardial hypertrophy indicated by HW/BW ratio and LW/BW ratio. B: Effect of DHEA on pressure overload-induced myocardial hypertrophy indicated by HW/BW ratio and LW/BW ratio. Each group consists of 5-10 rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-DHEA treated group. The number of rats utilized in this experiment is indicated on each column.

2-2-11. Sigma-1 受容体発現量に対する DHEA, E2 の効果

DHEA, E2 投与により、OVX-PO による心肥大及び心機能障害が改善する事から、sigma-1 受容体発現に対する DHEA, E2 の効果について検討した。OVX-PO により sigma-1 受容体の発現量は有意に減少した ($P < 0.01$ vs OVX 群; Fig. 16A, B)。DHEA 投与により、sigma-1 受容体の発現低下を有意に抑制された ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; 16A, B)、一方、E2 投与群では改善されなかった (Fig. 16A, B)。NE100 同時投与より、DHEA による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかった (Fig. 16A, B)。

次に、sigma-1 受容体発現調節が転写に関するのか明らかにするために、sigma-1 受容体 mRNA を解析した。OVX-PO により sigma-1 受容体 mRNA は変化しない。DHEA 投与により、sigma-1 受容体 mRNA レベルは有意に上昇した ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 16C)。しかし、E2 投与は効果を示さなかった (Fig. 16C)。NE100 同時投与により、DHEA の効果は完全に消失した (Fig. 16C)。これらの事から、DHEA による sigma-1 受容体の発現上昇作用は、一部転写調節を介するいることが明らかとなった。

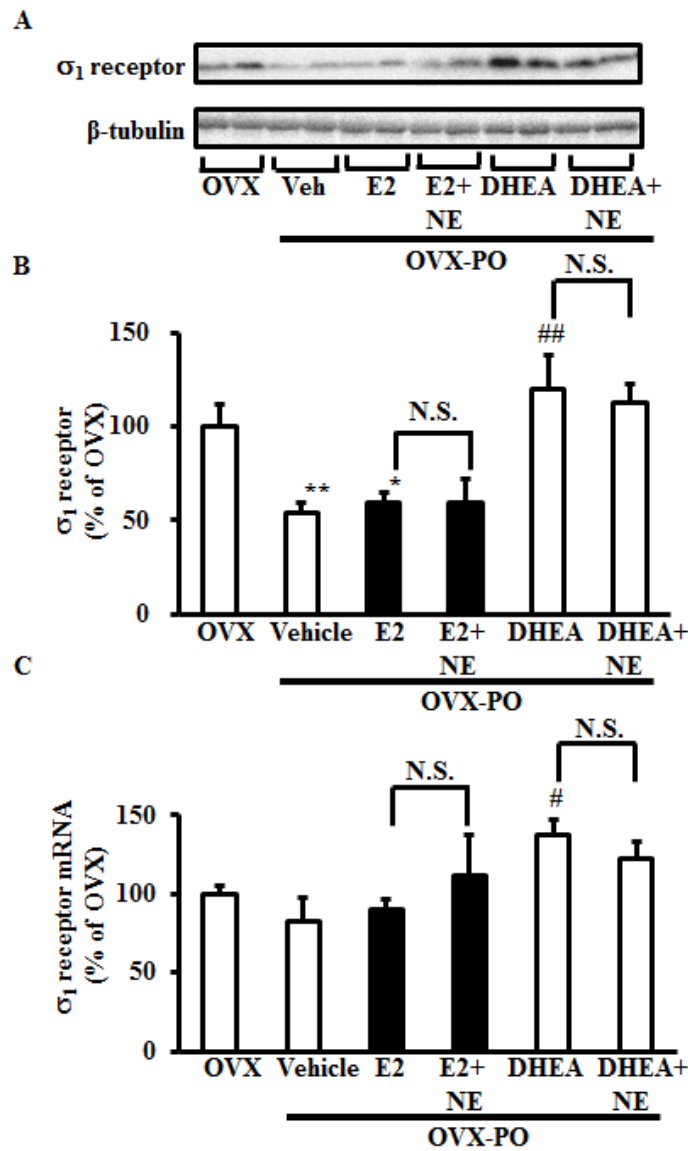


Fig. 16. Effect of E2, DHEA and NE-100 (NE) on sigma-1R expression.

A: Western blot analysis of sigma-1R and β -tubulin expression in the LV. B: Densitometry quantification of sigma-1R expression in the LV. C: Real-time PCR analysis of sigma-1R mRNA level in the LV. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ versus OVX group; ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group. The number of samples evaluated in this experiment is indicated on each column.

2-2-12. Akt のリン酸化に対する DHEA, E2 の効果

私達は、卵巣を摘出した雌性ラットにおいて、圧負荷による心肥大・心機能障害の際、ラット左心室心筋細胞において、Akt 活性が有意に低下する事を報告した (Bhuiyan et al., 2007; Bhuiyan et al., 2009b; Bhuiyan and Tagashira et al., 2010)。そこで、DHEA, E2 の心機能改善作用に対する Akt の関与を検討した。OVX-PO ラットにおいて、心臓の Akt の Ser 473 リン酸化反応は有意に低下し ($P < 0.05$ vs OVX 群)、DHEA, E2 投与により改善した ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群 vs. OVX-PO+DHEA; $P < 0.05$ vs OVX-PO 群 vs. OVX-PO+E2) (Fig. 17A, B)。NE100 同時投与により、DHEA の効果は消失するのに対して ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 18A, B)、E2 の効果は消失しなかった (Fig. 17A, B)。一方、Akt-Thr308 のリン酸化反応はいずれの群においても変化は見られなかった (Fig. 17A, B)。これらの事から、sigma-1 受容体を介する DHEA, E2 の心筋保護効果は Akt の活性上昇とよく相関することが示された。

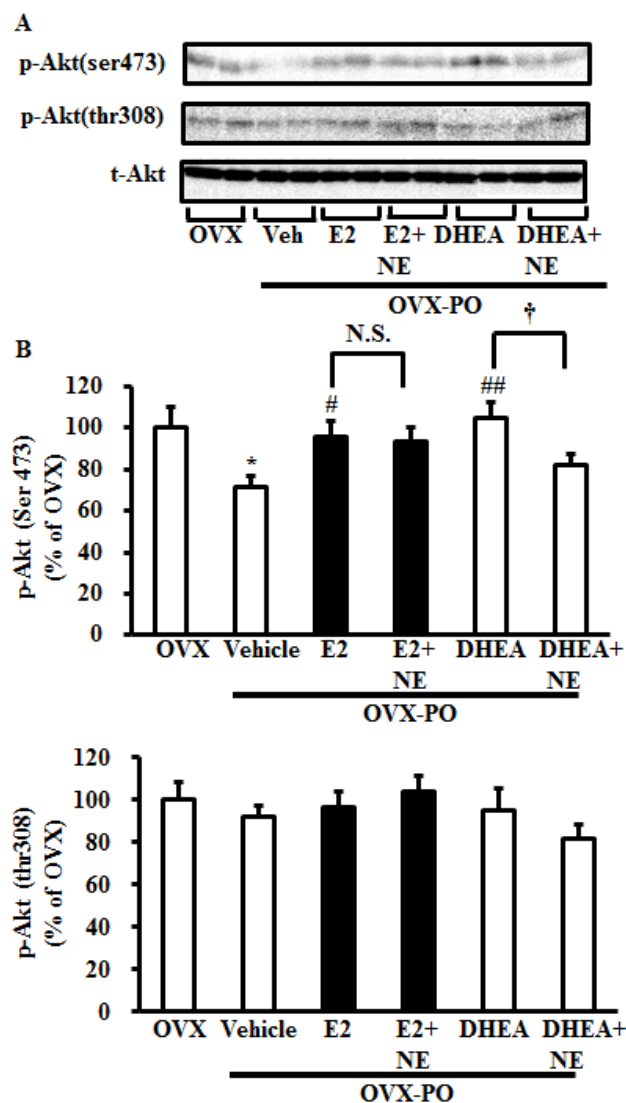


Fig. 17. Effect of E2, DHEA and NE-100 (NE) on Akt phosphorylation.

A: Western blot analysis of phospho-Akt (Ser-473) and phospho-Akt (Thr-308) in the LV. B: Densitometric quantification of immunoreactive bands of phospho-Akt (Ser-473) and phospho-Akt (Thr-308) in the LV. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ versus OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-DHEA treated group. The number of samples analyzed in this experiment is indicated on each column.

2-2-13. eNOS の発現量、及び eNOS のリン酸化に対する DHEA, E2 の効果

Akt の活性変化を確認するためにその基質タンパク質である eNOS のリン酸化反応を検討した。OVX-PO による心肥大・心機能障害に伴い、ラット左心室心筋細胞の eNOS の発現量は有意に減少した ($P < 0.05$ vs OVX 群; Fig. 18A, B)。同様に、eNOS の Ser1177 リン酸化レベルが有意に減少した ($P < 0.01$ vs OVX 群; Fig. 18A, B)。DHEA, E2 投与により、eNOS の発現量 ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群 Fig. 18A, B)、及び eNOS -Ser1177 リン酸化レベル ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 18A, B) は有意に上昇した。NE100 同時により、DHEA の効果は消失し ($P < 0.05$ vs OVX-PO+DHEA 群; Fig. 18A, B)、E2 の効果は消失しなかった (Fig. 18A, B)。eNOS の Ser1177 リン酸化レベルをタンパク質量で補正した値も上昇したことから (Fig. 18B)、DHEA による sigma-1 受容体の活性化反応が eNOS のリン酸化レベル上昇に関与すると考えられる。

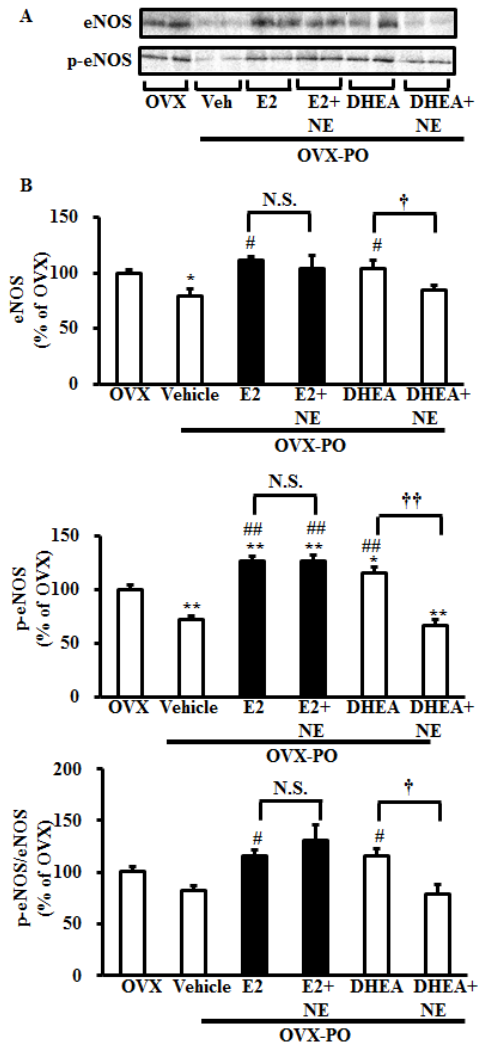


Fig. 18. Effect of E2, DHEA and NE-100 (NE) on eNOS expression and eNOS phosphorylation.

A: Western blot analysis of eNOS expression and eNOS phosphorylation in the LV. B: Densitometric quantification of immunoreactive bands of eNOS expression, eNOS phosphorylation and eNOS phosphorylation/eNOS total protein in the LV. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-DHEA treated group. The number of samples analyzed in this experiment is indicated on each column.

2-2-14. OVX-PO による心肥大・心機能障害に対する pentazocine の効果

次に、sigma-1 受容体アゴニストに汎用され、臨床でも鎮痛薬として用いられる pentazocine を用いて検討した。卵巣摘出後 2 週間後に腹部大動脈を 27G ニードルで狭窄し、狭窄後 1 日目から、pentazocine (0.5-1.0 mg/kg, p.o.) 及び sigma-1 受容体の選択的アンタゴニストである NE100 (1.0 mg/kg, p.o.) を 4 週間連続経口投与した。血行動態については、左心室の拡張期最小圧 (LVEDP)、左心室拡張期圧 (LVDP)、左心室収縮速度 ($\pm dp/dt$)、抹消血圧 (MABP)、そして心拍数 (HR) について検討した。OVX-PO (vehicle) 群において、有意な心機能低下が認められた ($P < 0.01$ vs OVX 群; Fig. 19A-F)。Pentazocine を慢性投与すると、心機能障害を改善した ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 19A-F)。NE100 を同時投与により、pentazocine の作用は完全に消失した ($P < 0.01$ vs OVX-PO+P1.0 群; Fig. 19A-F)。同様に、pentazocine 投与により、どちらも HW/BW と ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 20A)、Lung/BW の上昇も抑制された ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 20B)。一方、ラット体重にはいずれの群においても変化は見られなかった (Fig. 20C)。次に、心肥大のマーカーである ANP mRNA レベルについて検討した。ANP mRNA は、OVX-PO (vehicle) 群において、有意な上昇が認められた ($P < 0.05$ vs OVX 群; Fig. 20D)。また、pentazocine を慢性投与により低下した ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 20D)。

次に、マッソントリクローム染色により心筋の線維化について評価した。OVX-PO (vehicle) 群において、心筋細胞の線維化が確認できた。Pentazocine を慢性投与すると、心筋細胞の線維化を改善し、NE100 の同時投与により pentazocine による線維化改善作用は消失した。これらのことから、pentazocine による心肥大・心機能改善作用は sigma-1 受容体を介していることが確認できた。

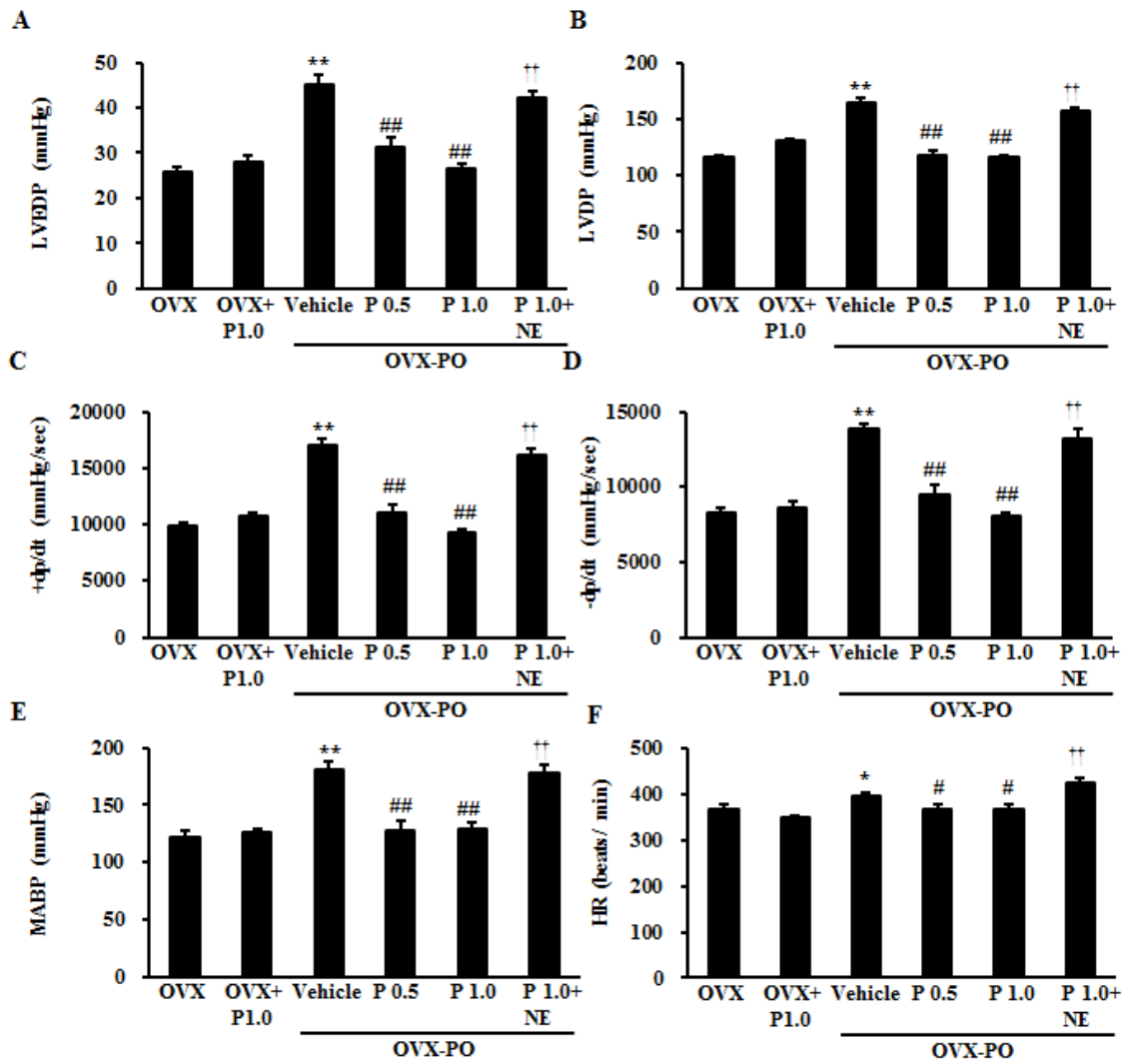


Fig. 19. Effect of pentazocine and NE-100 (NE) on hemodynamic measurements.

A: Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP). B: Left ventricular developed pressure (LVDP). C: Rates of left ventricular contraction (+dp/dt). D: Rates of left ventricular relaxation (-dp/dt). E: Mean arterial blood pressure (MABP). F: Heart rate (HR). Each group consists of 5-6 rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-P 1.0 treated group.

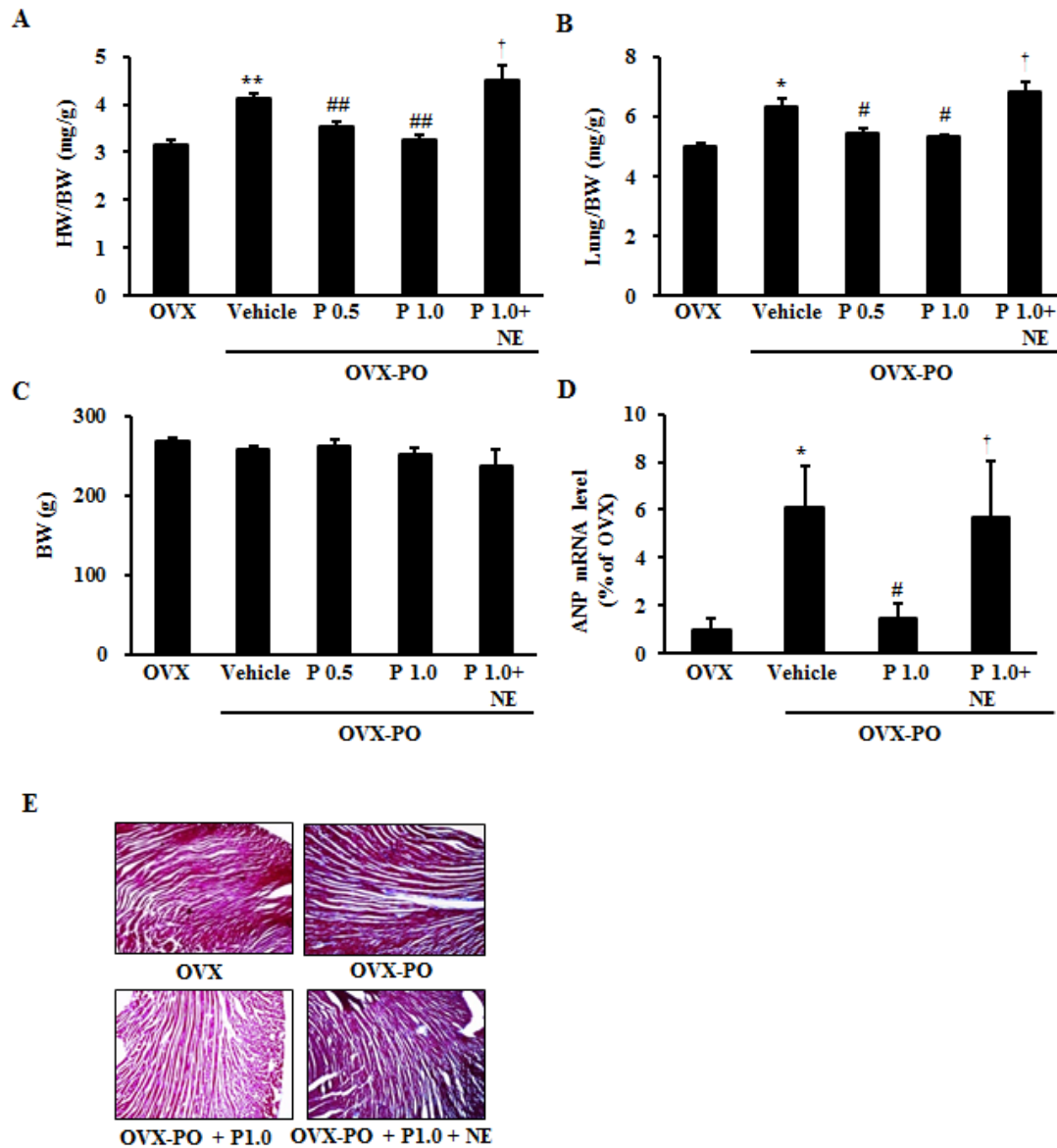


Fig. 20. Effect of pentazocine and NE-100 (NE) on pressure overload-induced cardiac hypertrophy in ovariectomized female rats.

A: Effect of pentazocine on pressure overload-induced myocardial hypertrophy indicated by HW/BW ratio. B: Effect of pentazocine on pressure overload-induced myocardial hypertrophy indicated by LW/BW ratio. C: Effect of pentazocine on BW in each group. D: Effect of pentazocine on increased ANP mRNA levels induced by OVX-PO. Each group consists of 5-6 rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-P 1.0 treated group. E: Effect of pentazocine on scar formation induced by OVX-PO.

2-2-15. Sigma-1 受容体、IP₃ 受容体発現量、および ATP 産生に対する pentazocine の効果

Pentazocine 投与により、OVX-PO による心肥大・心機能障害が改善する事から、sigma-1 受容体発現に対する pentazocine の効果を検討した。Pentazocine 投与により、用量依存的に sigma-1 受容体の発現低下を有意に抑制した ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 21A, B)。NE100 同時投与により、pentazocine の効果は消失した (Fig. 21A, B)。Pentazocine 投与群では、用量依存的に IP₃ 受容体の発現増加を有意に抑制し ($P < 0.01$ vs OVX-PO 群; Fig. 21A, B)、NE100 同時投与により、pentazocine の効果は消失した ($P < 0.05$ vs OVX-PO+P1.0 群; Fig. 21A, B)。

次に、免疫染色法により、sigma-1 受容体および IP₃ 受容体の心筋細胞での発現をラット心筋組織を用いて検討した (Fig. 21C)。Sigma-1 受容体は、心筋細胞質全体、特に T 管近傍の SR に多く局在が認められ、IP₃ 受容体と局在が一致した (Fig. 21C)。OVX-PO により sigma-1 受容体の発現量は減少し、IP₃ 受容体は増加するにも関わらず、共局在は消失した。Pentazocine 投与は、sigma-1 受容体の発現低下を抑制し、IP₃ 受容体発現増加を抑制することにより共局在は回復した。NE100 同時投与は、pentazocine による sigma-1 受容体の発現亢進には影響せずに、共局在を抑制した。

更に、これら免疫染色での結果を裏付けるため、免疫沈降法を用いて、sigma-1 受容体と IP₃ 受容体の結合を検討した。IP₃ 受容体で IP を行い、sigma-1 受容体で免疫ブロットを行った結果、OVX-PO により sigma-1 受容体の発現量は減少し、IP₃ 受容体は増加するにも関わらず、結合は有意に低下した ($P < 0.05$ vs OVX 群; Fig. 22B, C)。それに対し、pentazocine 投与群では、sigma-1 受容体の発現低下を抑制し、IP₃ 受容体発現増加を抑制することにより結合が有意に回復した ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 22B, C)。NE100 同時投与により、pentazocine の効果は消失した ($P < 0.05$ vs OVX-PO+P1.0 群; Fig. 22B, C)。また、sigma-1 受容体で IP を行い、IP₃ 受容体で免疫ブロットを行った結果、同様の結果が得られた (Fig. 22D)。次に ATP 産生を検討した。TAC 群と同様、OVX-PO により ATP 産生は有意に減少した ($P < 0.01$ vs OVX 群; Fig. 22E)。Pentazocine 投与により、ATP 産生を有意に改善した (P

< 0.01 vs OVX-PO 群; Fig. 22E)。NE100 同時投与により、pentazocine の効果は消失した (P < 0.01 vs OVX-PO+P1.0 群; Fig. 22E)。

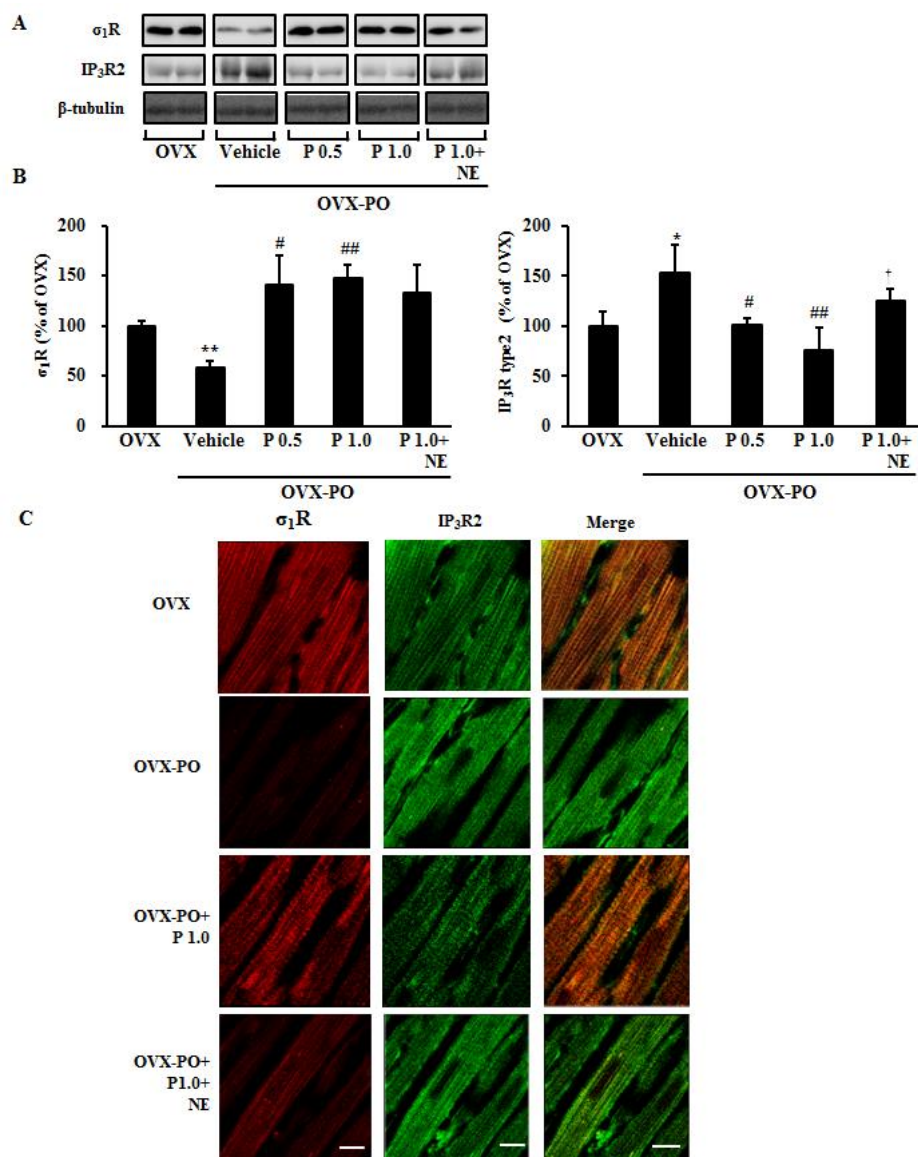


Fig. 21. Effect of pentazocine and NE-100 (NE) on σ_1R and IP₃R2 expression in OVX-PO rat hearts.

A: Western blot analyses of σ_1R and IP₃R2 in the LV. B: Densitometry quantification of σ_1R and IP₃R expression in the LV. Each group consists of 5-6 rats. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats. C: Immunofluorescence staining showing intracellular localization of σ_1R (red) and IP₃R2 (green). Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group. †, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-P 1.0 treated group.

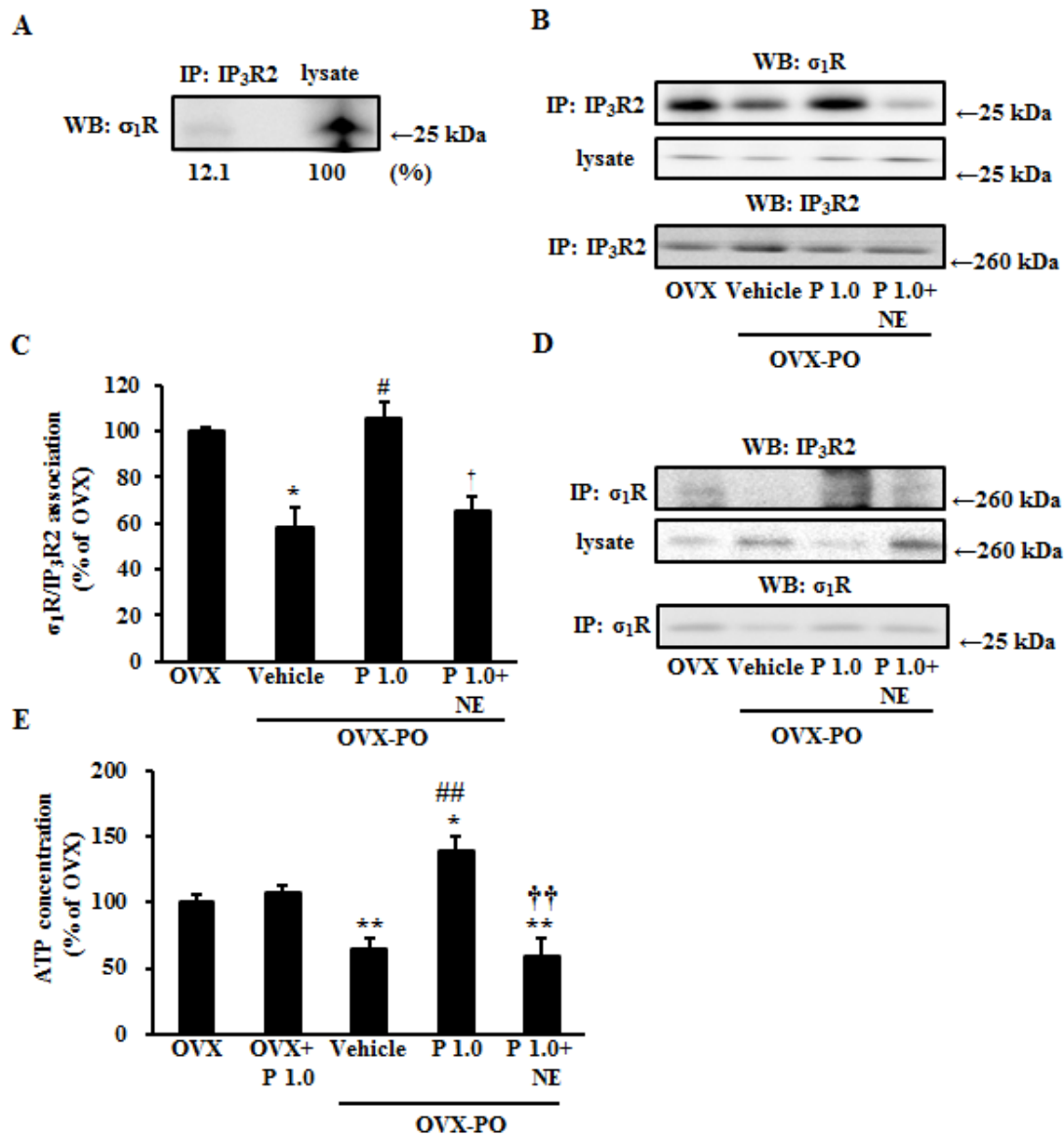


Fig. 22. Effects of pentazocine and NE-100 on σ_1 R/ IP₃R2 association and ATP content in OVX-PO rat hearts.

A: Immunoprecipitation of σ_1 R and IP₃R2 from rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti-IP₃R2 antibody, immunoprecipitants and heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti- σ_1 R antibody. The same amounts of proteins from lysate were used for immunoprecipitation. B: Immunoprecipitation of σ_1 R and IP₃R2 using rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti-IP₃R2 antibody, immunoprecipitants with heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti- σ_1 R antibody. C: Densitometric quantification of immunoreactive bands of σ_1 R immunoprecipitated by IP₃R2 in the LV. Data are expressed as percentages of the value of ovariectomized rats and are average of three independent assay. D: Immunoprecipitation of σ_1 R and IP₃R2 from rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti- σ_1 R antibody, immunoprecipitants with heart extracts were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti-IP₃R2 antibody. E: Measurement of cellular ATP content in the LV of OVX-PO female rats with or without drug treatment. Each group consists of 4-5 rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus OVX group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the OVX-PO-P 1.0 treated group.

2-2-16. Ryanodine 受容体発現量、および sigma-1 受容体発現に対する pentazocine の効果

Sigma-1 受容体が T 管近傍の SR に局在することから (Fig. 21C)、心臓の SR に発現し、心筋収縮に重要な役割を果たす ryanodine 受容体とも相互作用を示すのではないかと考え、sigma-1 受容体と ryanodine 受容体の結合について検討した。最初に、免疫染色法により、sigma-1 受容体および ryanodine 受容体の局在をラット心筋組織で調べた (Fig. 24A)。Sigma-1 受容体は、T 管近傍の SR に多く局在が認められ、ryanodine 受容体と局在が一致した (Fig. 24A)。OVX-PO により sigma-1 受容体の発現量は減少するのに対して、ryanodine 受容体は発現量に変化しない (Fig. 24B, C)。また、共局在は見られない。Pentazocine 投与により共局在が回復した。NE100 同時投与により、pentazocine の局在に対する効果は消失した

次に、免疫沈降法を用いて、sigma-1 受容体と ryanodine 受容体の結合を検討した。Ryanodine 受容体で IP を行い、sigma-1 受容体で免疫ブロットを行った結果、細胞抽出液中の 11.9 % の sigma-1 受容体が ryanodine 受容体の結合分画に回収された (Fig. 25A)。OVX-PO により sigma-1 受容体の発現量は減少し、ryanodine 受容体は変化しないが、結合は有意に低下した ($P < 0.05$ vs OVX 群; Fig. 25B, C)。Pentazocine 投与により、sigma-1 受容体の発現低下を抑制し結合は有意に改善した ($P < 0.05$ vs OVX-PO 群; Fig. 25B, C)。NE100 同時投により、pentazocine と ryanodine 受容体との結合は消失した ($P < 0.05$ vs OVX-PO+P1.0 群; Fig. 25B, C)。逆に、sigma-1 受容体で IP を行い、ryanodine 受容体で免疫ブロットを行った結果、同様の結果が得られた (Fig. 25D)。これらの結果から、sigma-1 受容体は IP₃ 受容体だけでなく、SR に存在する ryanodine 受容体とも相互作用を示すことが明らかとなった。

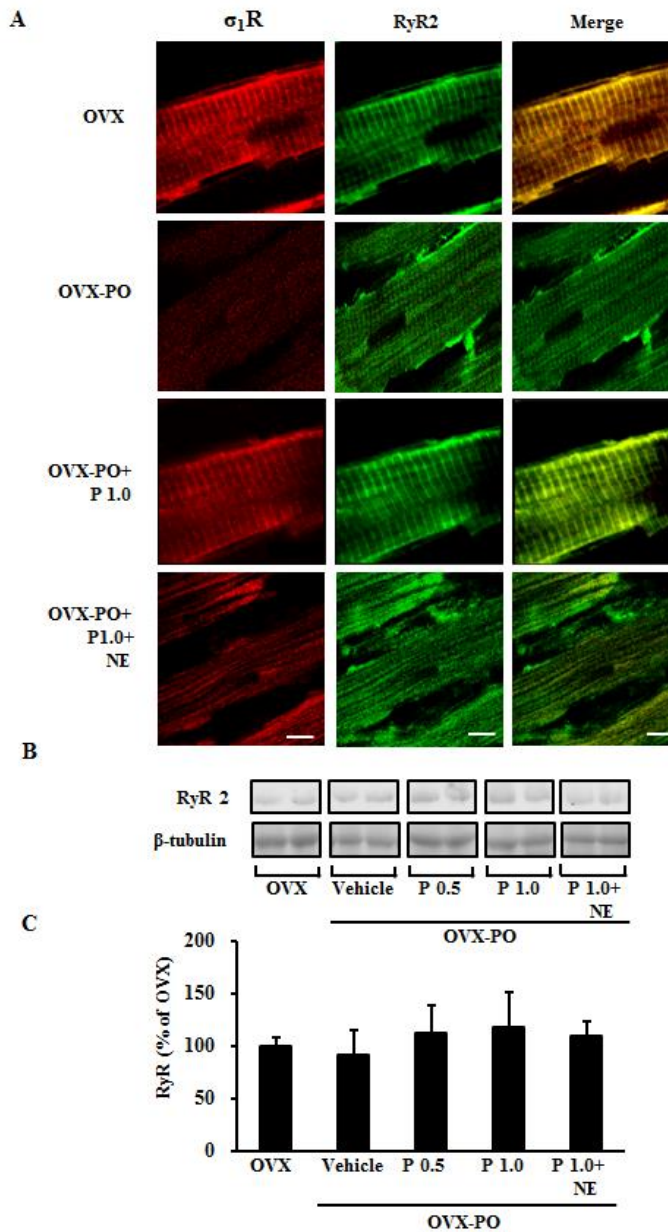


Fig. 23. Effect of pentazocine and NE-100 (NE) on RyRs expression in OVX-PO rat hearts.

A: Immunofluorescence staining showing intracellular localization of σ_1R (red) and RyRs (green). B: Western blot analysis of RyRs expression in the LV. C: Densitometry quantification of RyRs expression in the LV. Each group consists of 5-6 rats. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats. Each column represents the mean \pm S.E.M.

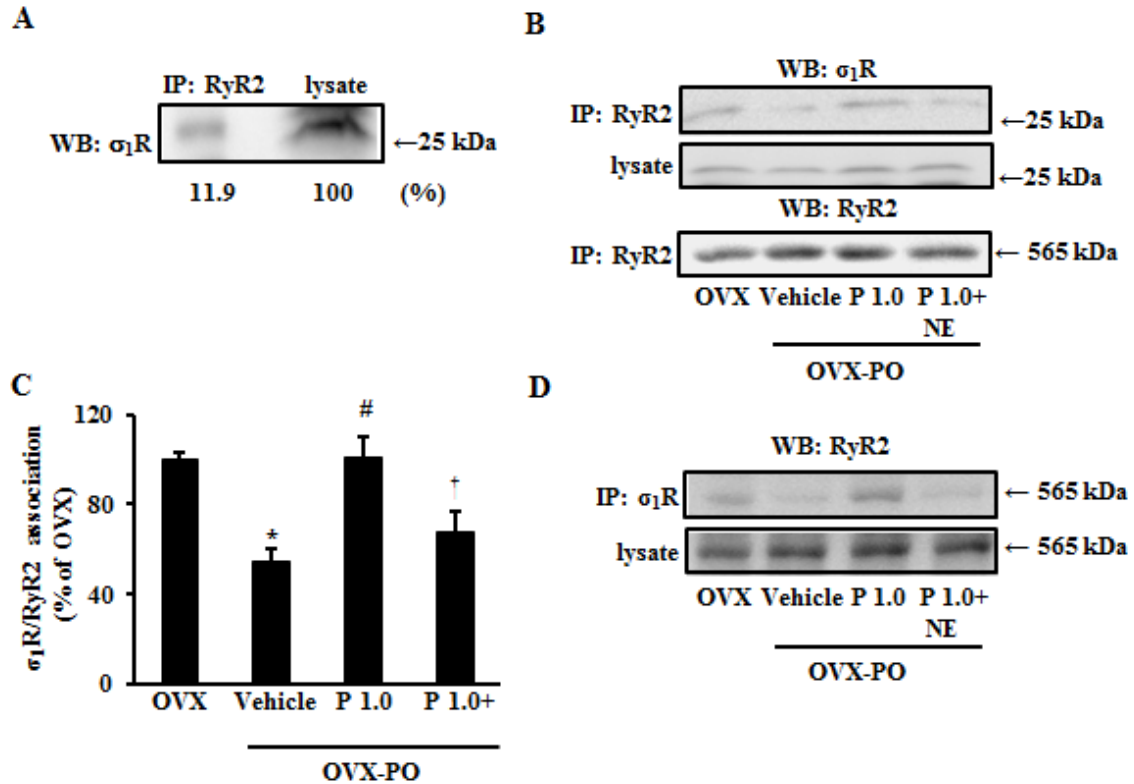


Fig. 24. Effects of pentazocine and NE-100 on σ_1 R/ RyR2 association in OVX-PO rat hearts.

A: Immunoprecipitation analysis of σ_1 R and RyR2 from rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti-RyR2 antibody, immunoprecipitants from heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analyses using anti- σ_1 R antibody. The same amounts of proteins from lysate were used for immunoprecipitation. B: Immunoprecipitation analysis of endogenous σ_1 R and RyRs using rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti-RyRs antibody, immunoprecipitants with heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti- σ_1 R antibody. C: Densitometric quantification of immunoreactive bands of immunoprecipitation analysis in the LV. Data are expressed as percentages of the value of sham treated ovariectomized rats and average of three times assay. Data are expressed as percentages of the value of ovariectomized rats. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ versus OVX group; #, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-vehicle treated group; †, $P < 0.05$ versus the OVX-PO-P 1.0 treated group. D: Immunoprecipitation analyses of σ_1 R and RyR2 using rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti- σ_1 R antibody, immunoprecipitants with heart extracts were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti-RyR2 antibody.

2-3. 考察

Sigma-1 受容体のリガンドが心機能に影響すること、培養心筋細胞において sigma-1 受容体リガンド結合部位が存在する事はすでに報告されている(Dumont et al., 1991; Ela et al., 1994)。同様に sigma 受容体リガンド ((+)-3PPP、(+)-pentazocine、haroperidol) が心筋収縮に影響することが知られている。例えば、(+)-3PPP、(+)-pentazocine、haroperidol などが心筋細胞への Ca^{2+} の流入、心筋収縮、脈拍を変動させることが示されている (Ela et al., 1994; Ela et al., 1996; Monassier et al., 2007; Novakova et al., 1995)。しかしながら、これらの作用が sigma-1 受容体を介するかどうかは不明である。本研究では、fluvoxamine が sigma-1 受容体に親和性を持つことに着目して、fluvoxamine は sigma-1 受容体を介して、心筋保護作用を発揮するという仮説を検証した。新しい知見として、1) fluvoxamine 慢性投与は、sigma-1 受容体を介して、TAC による心肥大、心機能障害を改善すること、2) 心機能障害と sigma-1 受容体の発現量低下が相関すること、3) sigma-1 受容体に作用しない paroxetine においてはこの作用が見られないこと 4) sigma-1 受容体を介するメカニズムとして、fluvoxamine が Akt/eNOS シグナルを活性化することを明らかにした。

Akt が直接 eNOS の Ser1177 をリン酸化し eNOS を活性化することは、ヒト eNOS リコンビナントを用い、証明されている (Fulton et al., 2001)。重要な知見として、fluvoxamine 投与は eNOS の Ser1177 のリン酸化を上昇させるだけでなく、eNOS のタンパク質発現も上昇することを示した。NE100 の処置により、fluvoxamine による eNOS の発現量の増加と eNOS のリン酸化反応は消失することから、心臓における eNOS の活性調節には sigma-1 受容体が関与すると考えられる。Sigma-1 受容体アゴニストである dehydroepiandrosterone (DHEA) は ERK1/2 活性依存的な非転写メカニズムを介した eNOS 活性化が起こるという報告がある (Simoncini et al., 2003)。しかしながら、TAC による心肥大では DHEA により ERK1/2 のリン酸化反応は変化しない。PKC α は、PKC のアイソフォームの中でも血管内皮細胞において主に発現しており、in vivo 及び in vitro において eNOS の Ser1177 のリン酸化を調節しているプロテインキナーゼである (Carrithers et al., 2005)。しかしながら、TAC

による心肥大と sigma-1 受容体アゴニスト投与では、PKC α のリン酸化は認められなかった。しかし、ERK1/2、PKC α に対する急性の効果については不明であり、さらに検討が必要である。

本研究では fluvoxamine と paroxetine は、臨床で用いられている用量と近い投与量を用いた。ヒト脳内における PET 試験により、fluvoxamine (50-200 mg/kg BW) は sigma-1 受容体に結合するのに対し、paroxetine (20 mg/kg BW) は結合しないことも確認されている (Hashimoto et al., 2009)。したがって、fluvoxamine の sigma-1 受容体機能調節は、ヒトにおいても機能していると考えられる。注目すべきことに、fluvoxamine などの SSRIs は、心疾患を伴ううつ病患者に対して安全であり、効果的な薬物であると考えられる。実際に、SSRIs は心伝導速度の低下による起立性低血圧や QT の変動などを示さない (Cooper et al., 1988; Fisch et al., 1985)。本研究は fluvoxamine は心疾患を伴う患者に安全に使用でき、特に心疾患を併発しているうつ病患者の治療に適しているというこれまでの臨床知見を支持している (Glassman et al., 2002; Rumsfeld et al., 2005; Swenson et al., 2003)。

ミトコンドリアは心筋細胞の約 30 % を占め、心筋の収縮に重要な ATP 産生のである。ミトコンドリアの断片化は、エネルギー産生の低下を引き起こし、マイトファジーを誘導し、細胞死を起こすことが培養細胞で報告されている (Gomes et al., 2011)。また、ミトコンドリアの機能調節が心肥大・心不全に重要な役割を果たしている (Ventura-Clapier et al., 2011)。例えば、ミトコンドリア融合に主要な役割を果たす Mfn 2 (de Brito et al., 2008)、Mfn 1 のダブルノックアウトマウスでは、ミトコンドリアの断片化が誘導され、週齢を重ねるごとに心機能障害が起こる (Chen et al., 2011)。IP₃ 受容体は、ER からミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送に必須であることが知られており (Cárdenas et al., 2010)、また、TCA 回路の酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素は Ca²⁺ 依存性である (Denton et al., 1972; McCormack et al., 1972)。本研究は、sigma-1 受容体刺激がミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を促進していることを心臓において初めて証明した。

さらに本研究において、sigma-1 受容体に親和性をもつステロイドホルモン DHEA は、エストロゲン補充療法に用いられている E2 と異なり、sigma-1 受容体を介して Akt を活性化することが明らかとなった。E2 は細胞内エストロゲン受容体による genomic な作用と、細胞膜エストロゲン受容体による non-genomic な作用があることが報告されており、non-genomic な作用により Akt が活性化されると一般的に考えられている (Chambliss et al., 2002)。Sigma-1 受容体アゴニストにより、Akt 活性化が起こることがいくつかの細胞で知られている (Nakano et al., 2010; Spruce et al., 2004; Wang et al., 2006)。例えば、PC12 細胞では、fluvoxamine 処置により Akt の活性化が起こる (Nakano et al., 2010)。一方、癌細胞において、sigma-1 受容体アンタゴニストである rimucazole は PI3K を抑制し、Akt のリン酸化を抑制する (Spruce et al., 2004)。さらに、水晶体細胞において siRNA による sigma-1 受容体ノックダウンすると、トロンビン刺激による Akt のリン酸化が抑制される (Wang et al., 2006)。しかしながら、sigma-1 受容体を介した Akt 活性化メカニズムは不明である。Akt の脱リン酸化酵素としても知られているカルシニューリン (Park et al., 2008) の活性化反応が sigma-1 受容体刺激により抑制される可能性も考えられる。Sigma-1 受容体を介した Akt 活性化メカニズムについて、今後のさらなる検討が必要である。

2-4. 小括

本章では、マウスとラットの心肥大モデルを用いて、sigma-1 受容体の心臓機能における役割を追究した。TAC および OVX-PO による病的な心肥大・心機能障害において、左心室筋細胞の sigma-1 受容体の発現量が減少した。それに伴って、ATP 産生が減少した。Sigma-1 受容体アゴニストの慢性投与は、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を増強し、心肥大抑制効果と心機能改善効果を示した (Fig. 26)。また、sigma-1 受容体刺激による Akt-eNOS シグナルを亢進させて、TAC による心肥大・心機能障害を改善した。従って、sigma-1 受容体アゴニストにより、ATP 産生亢進と Akt-eNOS シグナルを増強が心機能障害を改善することが示唆された。

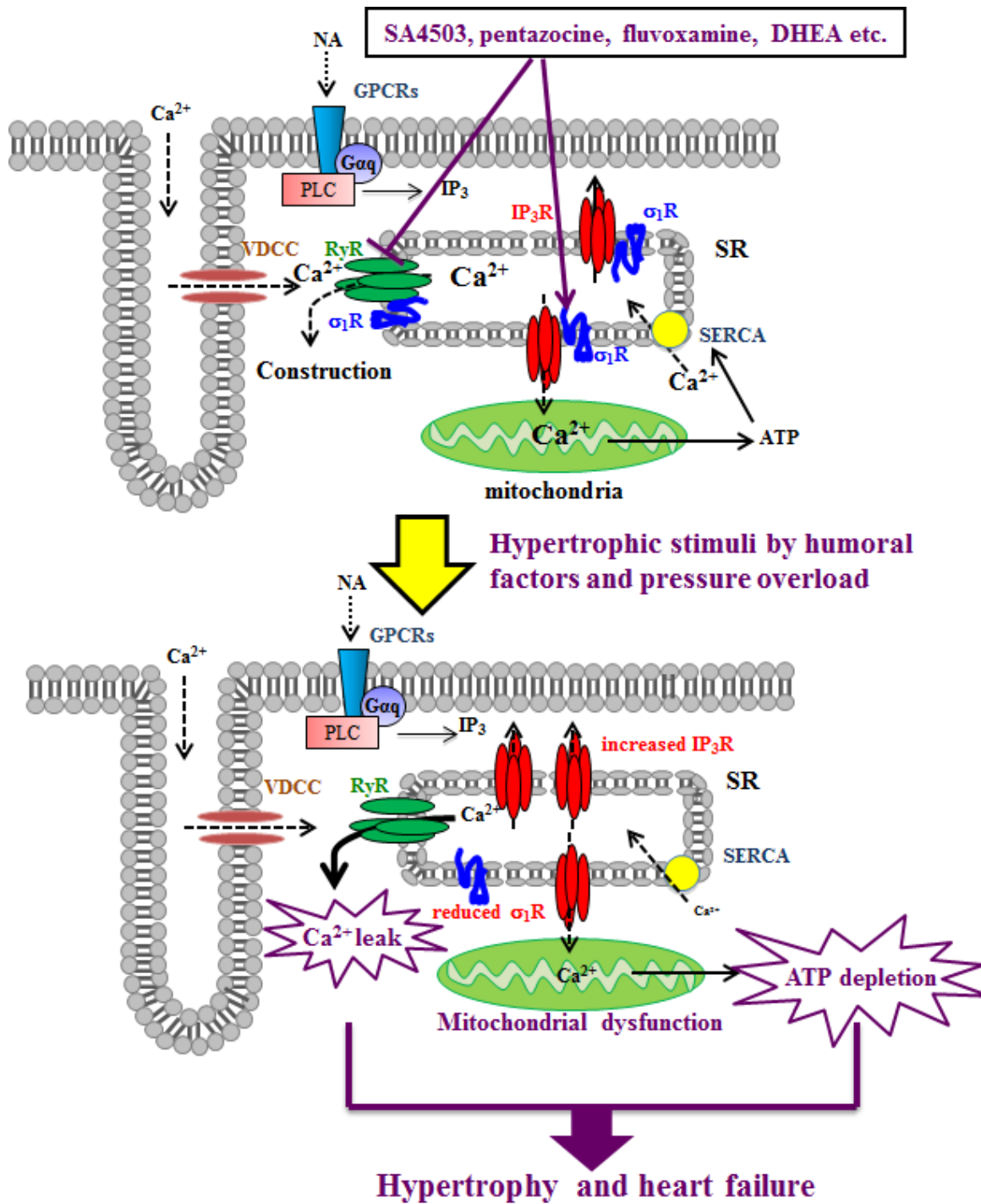


Fig. 25. Schematic representation of σ_1 R-mediated protection of cardiac hypertrophy. Pentazocine treatments suppress RyR2-mediated Ca^{2+} release from SR, leading to suppression of over-constriction. Our previous studies also defined that σ_1 R stimulation suppresses Ca^{2+} release through IP₃R2 in cardiomyocytes. On the other hand, σ_1 R stimulation promotes mitochondrial Ca^{2+} transport through IP₃R2 and in turn ATP production. However, under pathological conditions following prolonged hypertrophic stimuli such as humoral stress and pressure overload, σ_1 R is markedly downregulated in cardiomyocytes. Therefore, dysregulation of IP₃R2 and RyR2 promote Ca^{2+} leakage from SR and mitochondrial ATP production is largely impaired. The reduced mitochondrial Ca^{2+} entry likely promotes radical oxidative stresses-induced mitochondrial dysfunction. Importantly, SA4503 and pentazocine suppress Ca^{2+} leakage from SR and restores ATP production by stimulating mitochondrial Ca^{2+} transport from SR.

第三章

-心筋細胞における sigma-1 受容体の機能的役割-

3-1. 序論

第二章において、in vivo における sigma-1 受容体を介した心筋保護作用について、様々な sigma-1 受容体アゴニストを用いて検討した。しかし、それらの効果が心筋細胞に対する直接効果であるか不明である。実際に、fluvoxamine や pentazocine など sigma-1 受容体に強く結合するが、セロトニン系やモルヒネ受容体にも作用することから、sigma-1 受容体非依存性な作用であることも考えられる。これら問題点を改善するため、本章においては、培養心筋細胞を用い、神経体液性因子であるアンギオテンシン II (Ang II) による心筋細胞肥大・心筋細胞障害に対する sigma-1 受容体アゴニストの効果と機序について検討する。

Sigma-1 受容体は心筋組織において、T 管近傍の SR に存在し、IP₃ 受容体と会合する。また、心筋収縮に必須である ryanodine 受容体と会合することを本研究で証明した。しかし、その Ca²⁺ チャネル機能調節に対する効果は不明である。本章において、Ca²⁺ imaging 法を用いて、IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送、細胞質への Ca²⁺ 放出および ryanodine 受容体を介した細胞質への Ca²⁺ 漏出に対する sigma-1 受容体の役割について明らかにし、それに伴うミトコンドリア機能調節メカニズムについても合わせて明らかにする。

3-2. 実験結果

3-2-1. Sigma-1 受容体刺激の AngII による初代培養心筋細胞肥大に対する影響

Fluvoxamine による病的心肥大抑制効果が、心筋への直接的な効果か検討するため、初代培養心筋細胞を用いて Ang II による心筋細胞肥大への fluvoxamine, paroxetine 及び NE100 の効果を検討した。NE100 の単独処置群では、心筋細胞のサイズに変化しない。100 nM Ang II で 48 時間、心筋細胞を処置するとサイズは約 2 倍程度に拡大した ($P < 0.001$ vs Control 群; Fig. 26A, B, C)。Fluvoxamine 処置は濃度依存的に心筋細胞肥大を抑制した ($P < 0.001$ vs Ang II 群; Fig. 26A, B)。NE-100 を前処置すると、fluvoxamine の効果は消失した ($P < 0.001$ vs AngII+F 5.0 群; Fig. 26A, B)。SSRI であり、sigma-1 受容体には結合しない paroxetine では心肥大抑制作用は見られなかった (Fig. 26A, B)。これらのことから、SSRI の中で sigma-1 受容体刺激作用のある fluvoxamine のみが心筋細胞に作用することが示された。

次に、fluvoxamine の心肥大抑制効果における sigma-1 受容体の関与を確認するために、siRNA により sigma-1 受容体をノックダウンし、検討した。siRNA 処置により sigma-1 受容体発現は約 30%程度まで低下した ($P < 0.01$ vs control 群; Fig. 27A)。次に、ローダミン/ファロイジン染色により心筋の肥大を検討した。siRNA 処置した群において、統計学的に有意ではないが、心筋細胞が肥大する傾向が見られた。siRNA 処置すると fluvoxamine の心筋細胞肥大抑制作用が消失した ($P < 0.001$ vs AngII + F 5.0 群; Fig. 27B, C)。

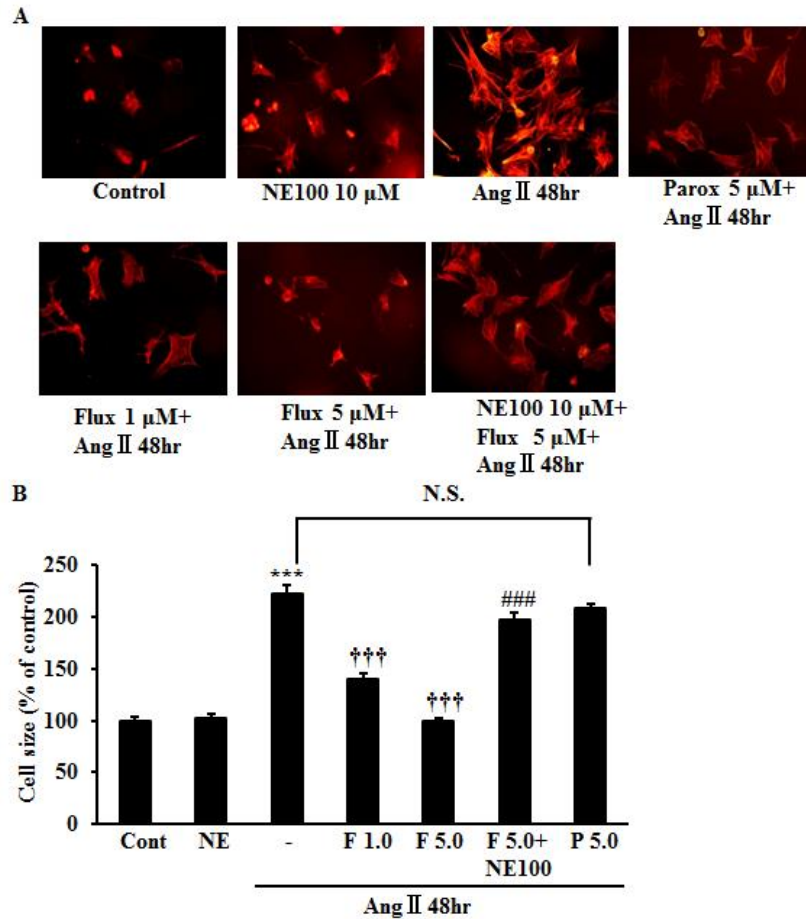


Fig. 26. Effects of fluvoxamine and paroxetine treatments on Ang II-induced hypertrophy in cultured cardiomyocytes.

(A) Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Rhodamine-conjugated Phalloidin, and processed for fluorescence microscopy. One hundred cells from randomly selected fields were evaluated for cell size in each condition. (B) Cell size is expressed as a percentage of the relative surface area in each condition compared to control cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. ***, $P < 0.001$ versus the control group; †††, $P < 0.001$ versus the Ang II treated group; ###, $P < 0.001$ versus the Ang II plus fluvoxamine 5 μ M (F 5.0) treated group.

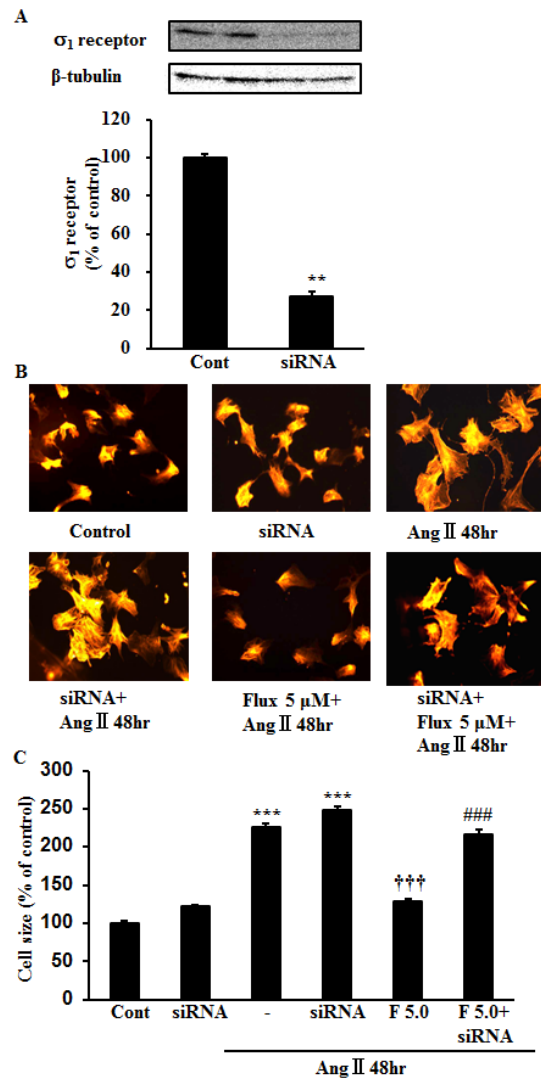


Fig. 27. Effect of Sig-1R siRNA on fluvoxamine-induced antihypertrophic effect in cultured cardiomyocytes.

(A) Western blot analysis and densitometric quantification of σ_1 R expression with (siRNA) or without (Control) siRNA σ_1 R treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody showed equal protein loading in each lane. Data are expressed as percentages of the value of control. (B) Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Rhodamine-conjugated Phalloidin, and processed for fluorescence microscopy. One hundred cells from randomly selected fields were examined in each condition. (C) Cell size results are expressed as surface area relative to control cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. Multiple comparisons were done by a one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett test. **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ versus the control group; †††, $P < 0.001$ versus the Ang II treated group; ###, $P < 0.001$ versus the Ang II plus fluvoxamine 5 μ M (F 5.0) treated group.

3-2-2. Fluvoxamine による sigma-1 受容体を介した心筋保護メカニズム

Fluvoxamine 処置により、AngII による心筋細胞肥大が抑制されることから、sigma-1 受容体発現に対する fluvoxamine の効果について培養細胞で検討した。AngII 72 時間処置により sigma-1 受容体の発現量は有意に減少した ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 28B)。fluvoxamine 処置により、sigma-1 受容体の発現低下を有意に抑制された ($P < 0.05$ vs Ang II 群; Fig. 28A)。NE100 前処置により、fluvoxamine による sigma-1 受容体の発現亢進は消失しなかった (Fig. 28A, B)。これらのことから、fluvoxamine による sigma-1 受容体の発現調節作用は、NE100 により阻害されないことが *in vitro* でも確認できた。次に、IP₃ 受容体の発現量について検討した。AngII 72 時間処置により IP₃ 受容体の発現量は有意に上昇した ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 28B)。Fluvoxamine 処置により、IP₃ 受容体の発現上昇を有意にされ ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 28B)、NE100 前処置は fluvoxamine の効果を消失させた ($P < 0.05$ vs AngII+Flux 群; Fig. 28B)。

次に、免疫染色法により、sigma-1 受容体および IP₃ 受容体の局在について培養細胞を用いて検討した (Fig. 28C)。Sigma-1 受容体は IP₃ 受容体と部分的に共局在した (Fig. 28C)。AngII 72 時間処置により sigma-1 受容体の発現量は細胞全体的に減少し、IP₃ 受容体は増加する。同時に、共局在が見られない。Fluvoxamine 処置により、sigma-1 受容体の発現低下は抑制され、IP₃ 受容体発現増加を抑制し、共局在も回復した。NE-100 前処置は共局在を阻害した。

さらに、IP₃ 受容体とミトコンドリアの共局在について免疫染色法を用いて検討した (Fig. 28D)。ミトコンドリアの染色には、ミトコンドリア膜電位依存性に取り込まれる MitoTracker Red CMXRos を用いた。ミトコンドリアの形態は、AngII 曝露において膜電位が低下していること、また、断片化が誘導されていることが示された。Fluvoxamine 処置により、膜電位の低下が抑制され、またミトコンドリアの断片化を抑制された。NE-100 前処置により、これらミトコンドリア保護作用は消失した。IP₃ 受容体とミトコンドリアの共局

在に関して、無処置では細胞質全体に共局在認められるのに対し、AngII 72 時間処置により IP₃ 受容体とミトコンドリアの共局在は細胞全体的で減少した。一方、fluvoxamine 処置群では、IP₃ 受容体とミトコンドリアの共局在は改善された。NE100 前処理により、fluvoxamine の効果は消失した。

Ang II により引き起こされる心筋細胞死について、TUNEL 染色を用いて検討した。コントロール群に比較し、100 nM Ang II 処置により、心筋細胞死が誘導された ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig.29)。Fluvoxamine の処置によって、心筋細胞死は有意に抑制された ($P < 0.05$ vs Ang II 群; Fig. 29)。NE-100 を前処置すると、fluvoxamine の保護効果は消失した ($P < 0.05$ vs AngII+Flux 群; Fig. 29)。

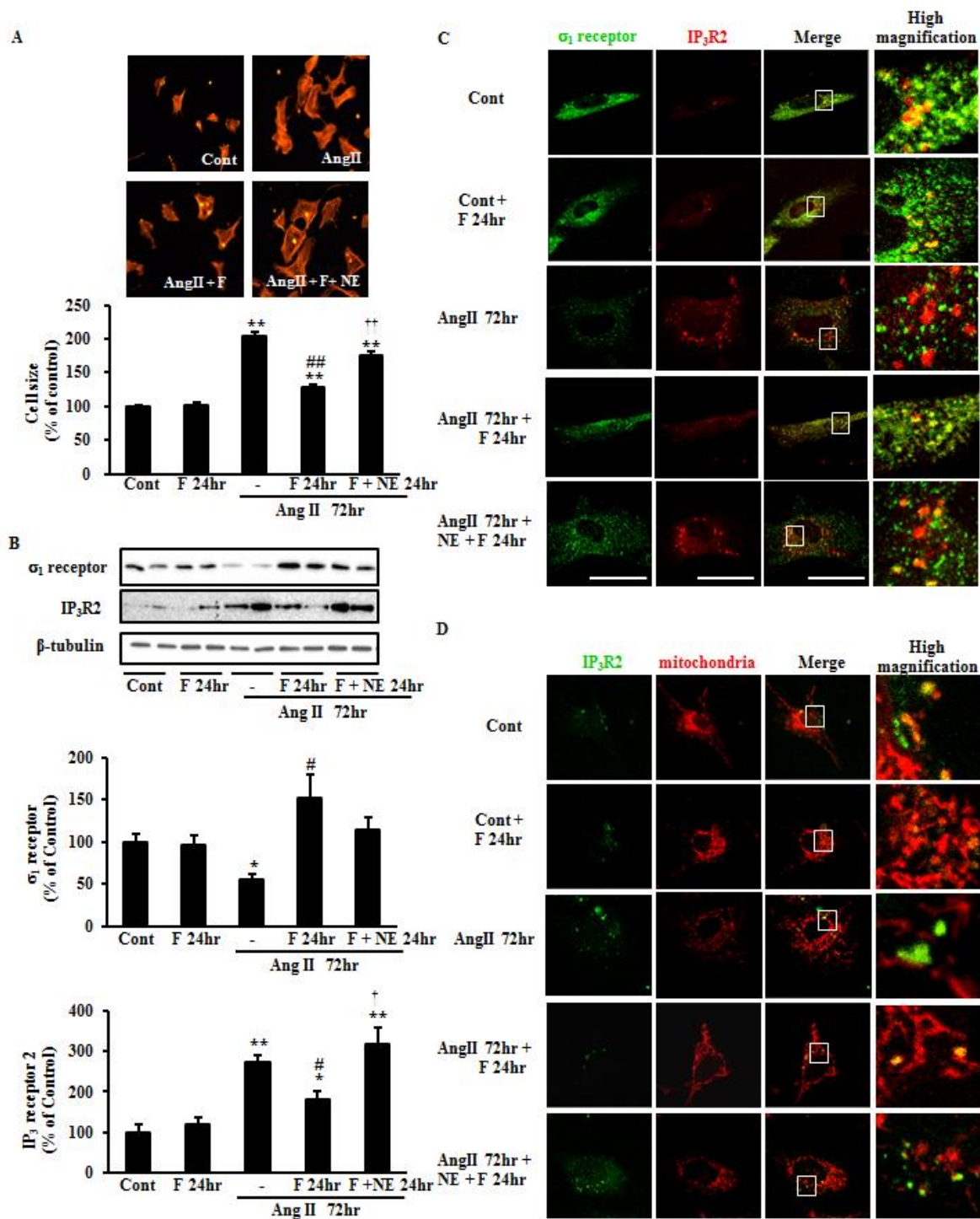


Fig. 28. Changes in σ_1 R intracellular localization and expression following induction of cardiomyocyte hypertrophy by Ang II

Immunofluorescent staining showing cardiomyocyte size of NRVMs *stained with* rhodamine-conjugated phalloidin. (B) Western blot analysis and densitometry quantification of σ_1 R and IP₃R2 expression in NRVMs (n=4). Data are expressed as percentages of the value of control cells (mean \pm S.E.M.). (C) Immunofluorescence staining showing intracellular localization of σ_1 R (green) and IP₃R2 (red). (D) Immunofluorescence staining showing IP₃R2 (green) and MitoTracker (red) localization. Scale bar = 15 μ m. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 5 μ M fluvoxamine (F)-treated cells.

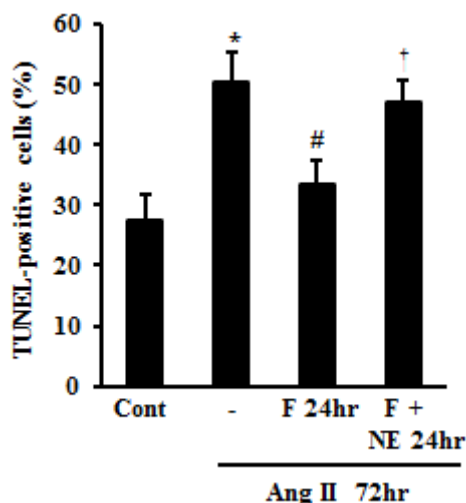


Fig. 29. Effects of σ_1 R activationAng II-induced apoptosis in NRVMs.

The quantitative analysis of apoptotic cells in NRVMs at different treatment conditions (n=4). *, $P < 0.05$ versus the control cells; #, $P < 0.05$ versus the Ang II treated cells; †, $P < 0.05$ versus the Ang II plus 5 μ M fluvoxamine (F) treated cells.

3-2-3. 培養心筋細胞におけるミトコンドリア Ca^{2+} 輸送に対する fluvoxamine の効果

IP_3 受容体の機能に対する fluvoxamine の作用を確認するために、 IP_3 依存性のミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送および細胞質への Ca^{2+} 放出について Ca^{2+} imaging 法を用いて検討した。ミトコンドリアの Ca^{2+} 指示薬として 5' 末端側にミトコンドリア移行シグナルを組み込んだ retimetric-pericam を用いた(Nagai et al., 2001; Shioda et al., 2012)。細胞質の Ca^{2+} 指示薬として Fura-2AM を用いた。Ang II 72 時間暴露により PE 刺激によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は、有意に抑制された ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 30A-C)。一方、fluvoxamine 処置によりほぼ完全に改善した ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig.30A-C)。また、NE-100 前処置により fluvoxamine の効果は完全に消失した ($P < 0.05$ vs AngII+Flux 群; Fig. 30A-C)。次に、 IP_3 受容体を介した細胞質への Ca^{2+} 放出について検討した。Ang II 72 時間暴露により細胞質への Ca^{2+} 放出は、ミトコンドリアと同様に、有意に抑制された ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig.30D-F)。一方、fluvoxamine 処置により部分的に改善された ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 30D-F)。しかし、NE-100 前処置により fluvoxamine の効果は消失しなかった (Fig. 30D-F)。

さらに、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送の指標として細胞内 ATP 含有量について検討した。AngII 暴露により有意に減少した ATP 量は ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 30G)、fluvoxamine 処置によりほぼ完全に改善した($P < 0.05$ vs Ang II 群; Fig. 30G)。また、NE-100 前処置により fluvoxamine の効果は完全に消失した ($P < 0.05$ vs AngII+Flux 群; Fig. 30G)。さらに、sigma-1 受容体/ IP_3 受容体を介した ATP 産生量を検討するため、 IP_3 産生型の刺激の PE 刺激による ATP 産生量について検討した。後述するが、PE による ATP 産生増加作用はミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} ユニporter (MCU) の阻害剤である Ru360 によって抑制されることを確認している (Fig. 30G)。また、PE 刺激後 15 分後に ATP 産生量がプラトーになることから刺激後 15 分後に細胞は回収した (Fig. 32E)。コントロールでは PE 刺激により ATP 産生量は 180%まで上昇し($P < 0.05$ vs 無処置群; Fig. 30G)、AngII 暴露により PE の刺激効果は消失した (Fig. 30G)。また、fluvoxamine 処置群では、PE 刺激効果はほぼ完全に回復した。NE100 前処置により fluvoxamine の効果は消失した (Fig. 30G)。これ

らのことから fluvoxamine は培養心筋細胞において、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を増強することが明らかとなった。

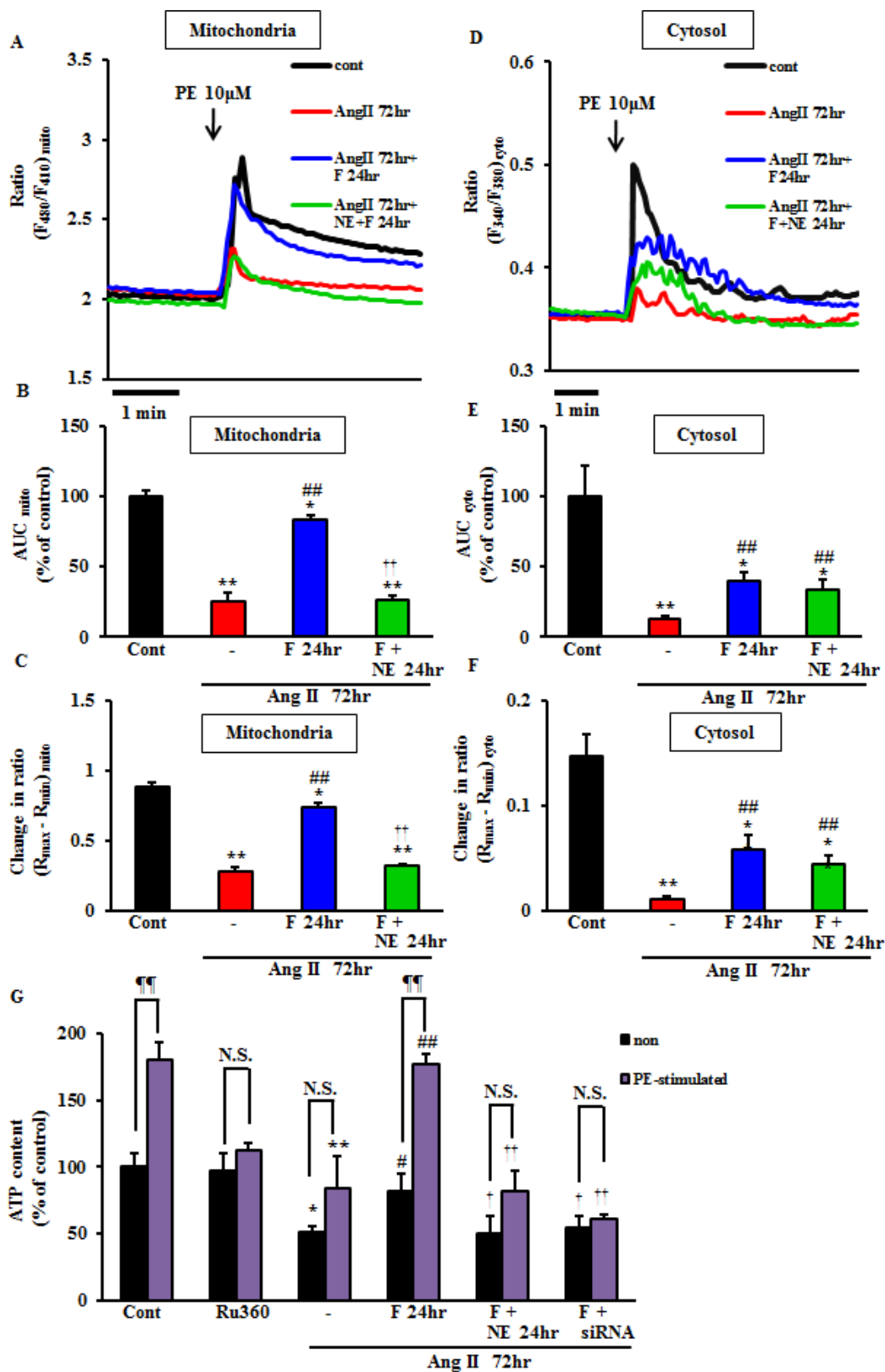


Fig.30. Effects of chronic fluvoxamine treatment on PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria and to the cytosol and on mitochondrial ATP content.

(A) Time courses of PE-induced Ca^{2+} influx to mitochondria. (B) Area under the curve (AUC) quantification of PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria and (C) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. (D) Time courses of PE-induced Ca^{2+} release to the cytosol. (E) AUC quantification of PE-induced Ca^{2+} release to the cytosol and (F) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$. Each group consists of greater than 10 cells. Bar graph data are expressed average of two times assay. Each bar graph consists of greater than 20 cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. (G) Measurement of cellular ATP content with or without 10 μM PE stimulation (n=4). Data are expressed as percentages of the value of control cells (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 5 μM fluvoxamine (F)-treated cells; ¶¶, $P < 0.01$ versus non-stimulated cells.

3-2-4. 培養心筋細胞における AngII 暴露後のミトコンドリア Ca^{2+} 輸送に対する fluvoxamine の急性効果

Fluvoxamine、NE-100 の急性効果を検討するため、PE 刺激を行う 1 時間前に fluvoxamine を処置して検討した。Ang II 48 時間刺激によりミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は、有意に抑制されたのに対し ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 31A-C)、fluvoxamine 急性処置は部分的に改善した ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 31A-C)。一方、Ang II 48 時間暴露後に細胞質への Ca^{2+} 放出は、ミトコンドリアと同様に、有意に抑制されたのに対し ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 31D-F)、fluvoxamine 処置により改善作用は見られなかった (Fig. 31D-F)。AngII 暴露により ATP 量は有意に増加した ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 31G)。一方、fluvoxamine 処置により変化が見られなかった (Fig. 31G)。次に、PE 刺激による ATP 産生量について検討した。コントロールでは PE 刺激により ATP 産生量は約 180%まで上昇した ($P < 0.05$ vs 未処置群; Fig. 31G)。しかし、Ang II 48 時間暴露により PE の効果は消失した (Fig. 31G)。Fluvoxamine 急性処置群および NE-100 急性同時処置では、PE 刺激による ATP 産生は変化はみられない (Fig. 31G)。これらのことから fluvoxamine 急性では、sigma-1 受容体/ IP_3 受容体を介したミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は促進するが、ATP 産生および細胞質への Ca^{2+} 放出は影響しないと考えられる。

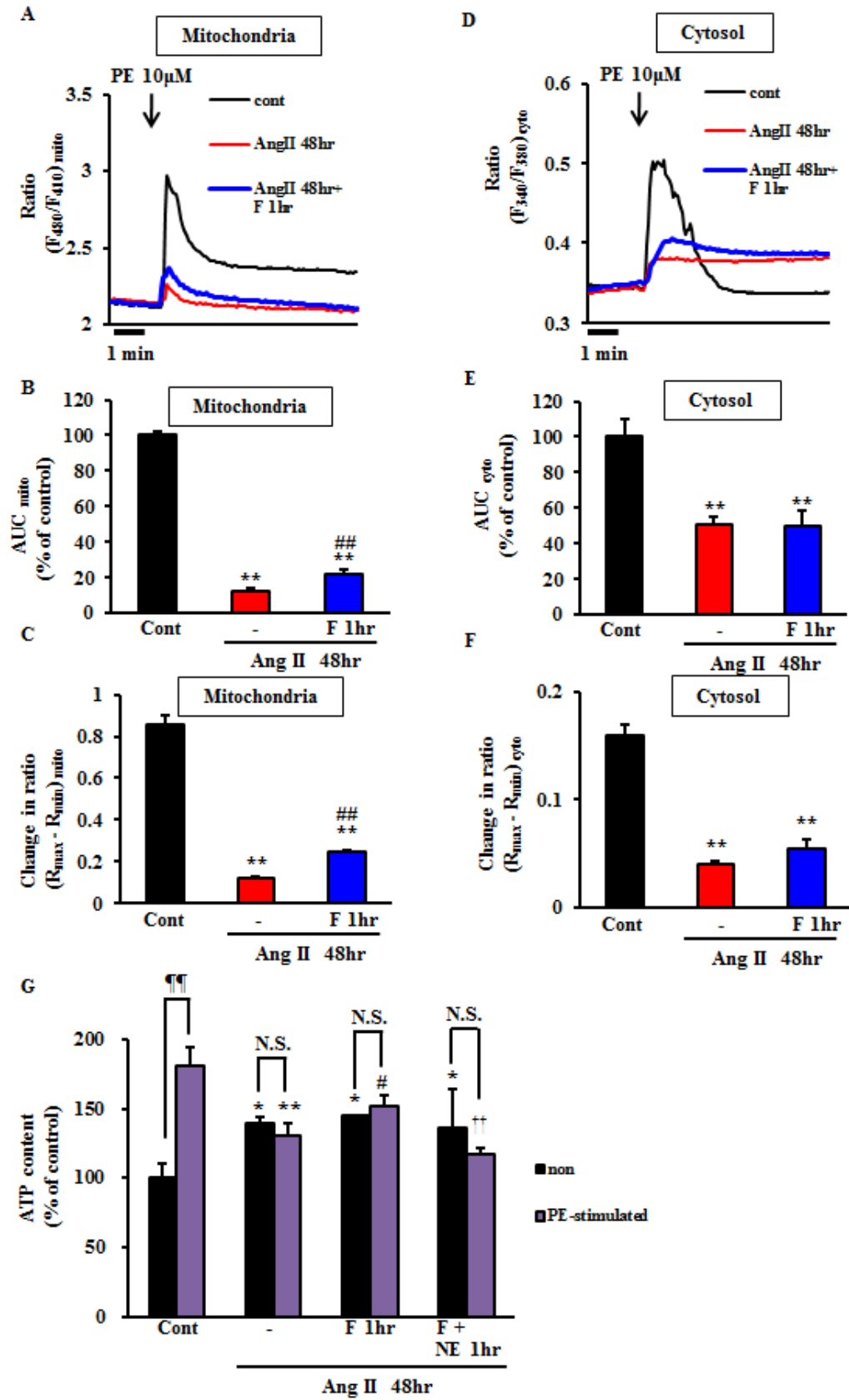


Fig. 31. Effects of acute fluvoxamine treatment of Ang II-treated cells on PE-induced Ca^{2+} mobilization to mitochondria and the cytosol and on mitochondrial ATP content.

(A) Time courses of PE-induced Ca^{2+} influx to mitochondria in Ang II-treated NRVMs with various treatment conditions during the last 1 hr. (B) Area under the curve (AUC) quantification of PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria and (C) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. (D) Time courses of PE-induced Ca^{2+} release to the cytosol. (E) AUC quantification of PE-induced Ca^{2+} release to the cytosol and (F) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$. Bar graph data are expressed average of two times assay. Each bar graph consists of greater than 20 cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. (G) Measurement of cellular ATP content with or without 10 μM PE stimulation (n=4). Data are expressed as percentages of the value of control cells (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus 5 μM fluvoxamine (F)-treated cells; ¶¶, $P < 0.01$ versus non-stimulated cells.

3-2-5. 培養心筋細胞におけるミトコンドリア Ca^{2+} 輸送に対する fluvoxamine の急性効果

Fluvoxamine、NE-100 の急性効果を検討した。Fluvoxamine 急性(1時間)処置によりミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は有意に促進した ($P < 0.01$ vs 無処置群; Fig. 32A, B)。一方、NE-100 急性処置によりミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は有意に抑制された ($P < 0.01$ vs 無処置群; Fig. 32A-C)。また、fluvoxamine 急性処置によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送促進作用は、NE-100 急性同時処置により消失した($P < 0.01$ vs fluvoxamine 急性処置群; Fig. 32A, B)。一方、細胞質への Ca^{2+} 放出は、fluvoxamine 急性処置により有意に抑制された ($P < 0.01$ vs 無処置群; Fig. 32C, D) のに対し、NE-100 急性処置により有意に促進された ($P < 0.01$ vs 無処置群; Fig. 32 C, D)。NE-100 同時処置により fluvoxamine の効果は消失した($P < 0.01$ vs fluvoxamine 急性処置群; Fig. 33 C, D)。Fluvoxamine 急性処置により細胞 ATP 含有量に変化しない (Fig. 32F)。無処置では PE 刺激による ATP 産生量は約 180%まで上昇した($P < 0.05$ vs 未処置群; Fig. 32F)。Fluvoxamine あるいは NE-100 急性処置は PE 刺激による ATP 産生量に影響しなかった。

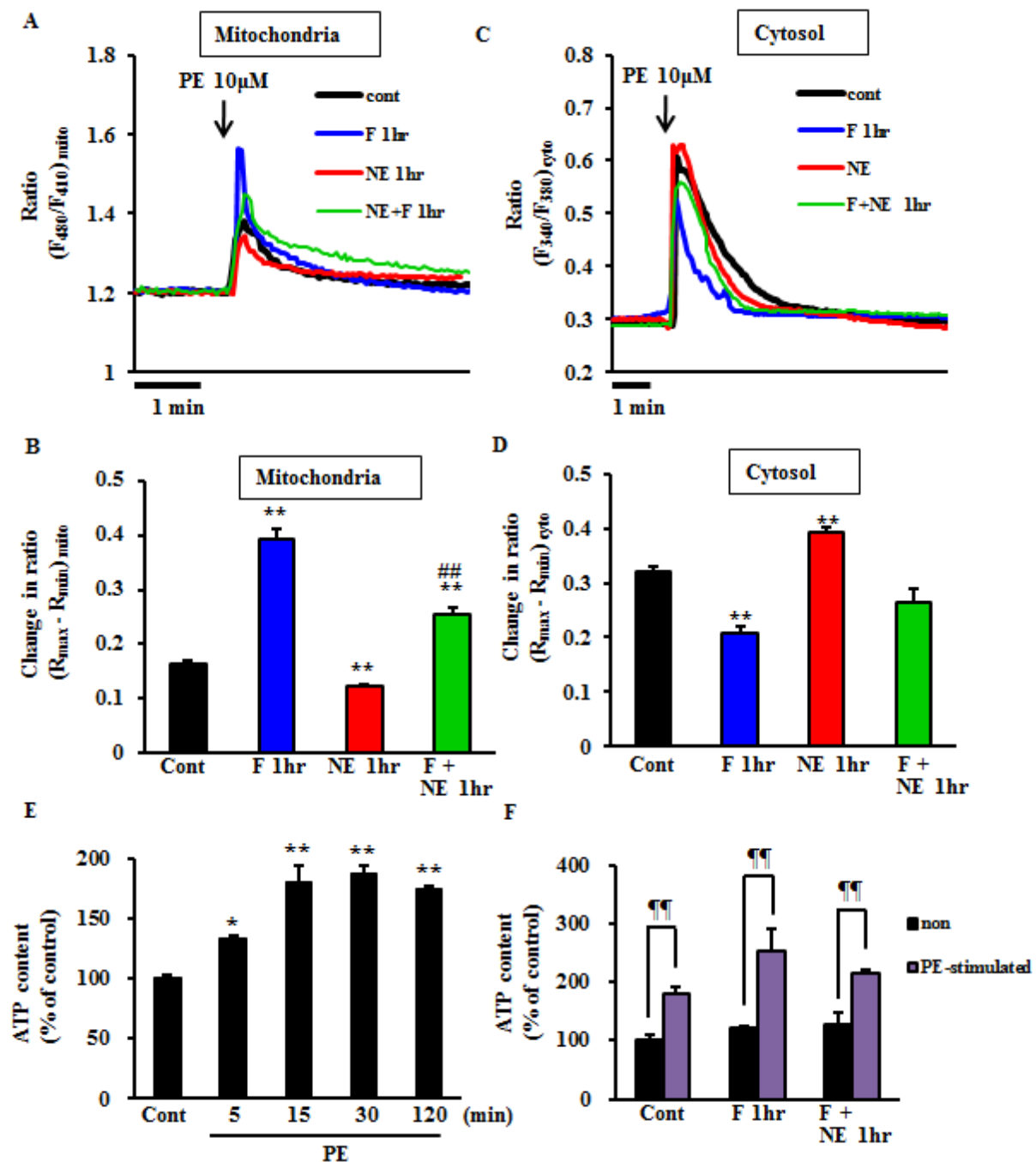


Fig. 32. Acute effects of fluvoxamine on PE-induced Ca^{2+} mobilization to mitochondria and the cytosol and on mitochondrial ATP content.

(A) Time courses of PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria in NRVMs without Ang II exposure in various treatment conditions and (B) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. (C) Time courses of PE-induced Ca^{2+} release to the cytosol and (D) peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$. Bar graph data are expressed average of two times assay. Each bar graph consists of greater than 20 cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. (E) ATP content in naïve NRVMs at different time-points after PE exposure (5, 10,

15, 30, and 120 min). The highest ATP levels were reached by 15 min after PE-stimulation. (F) Measurement of cellular ATP content with or without 10 μ M PE stimulation (n=4). Data are expressed as percentages of the value of control cells (mean \pm S.E.M.). **, $P < 0.01$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 5 μ M fluvoxamine (F)-treated cells; ¶¶, $P < 0.01$ versus non-stimulated cells.

3-2-6. 培養心筋細胞における ryanodine 受容体を介した Ca^{2+} 漏出に対する sigma-1 受容体アゴニストの効果

第二章において、in vivo における sigma-1 受容体と ryanodine 受容体の会合が確認されたことから、ryanodine 受容体刺激薬である caffeine 刺激による細胞質への Ca^{2+} 放出について検討した。Fluvoxamine 1 時間処置により細胞質への Ca^{2+} 放出は、有意に抑制された ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 33A, B)。また、caffeine 刺激のみではその特異性に問題があることから、ryanodine 受容体開口薬である ryanodine による Ca^{2+} 漏出を検討した。Caffeine 刺激と同様に fluvoxamine 1 時間処置により細胞質への Ca^{2+} 放出は、有意に抑制された ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 33C,D)。さらに、他の sigma-1 受容体高親和性アゴニストである pentazocine 1 時間処置においても ryanodine による細胞質への Ca^{2+} 漏出は、有意に抑制された ($P < 0.05$ vs Control 群; Fig. 33B, C)。これらのことから、sigma-1 受容体を刺激は ryanodine 受容体を介した Ca^{2+} 漏出を抑制することが示された。

次に、pentazocine による ryanodine 受容体を介した心肥大抑制作用がオピオイド受容体 (μ , κ , δ) を介していないのかを確認した。無処置に比較し、100 nM Ang II 48 暴露後に細胞サイズは約 2 倍に増大した ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 34D, E)。Ryanodine 受容体阻害剤であるダントロレン処置は、濃度依存的に心筋細胞肥大を抑制した ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 34D, E)。また、pentazocine の処置によって、濃度依存的に心筋細胞肥大は抑制された ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 34D, E)。NE-100 を前処置により pentazocine 作用は消失した ($P < 0.01$ vs AngII+P1.0 群; Fig. 34D, E)。しかし、 μ 受容体阻害薬である cyprozone、 κ 受容体阻害薬である DIPPA、 δ 受容体阻害薬である naltrindole によつては消失しなかった。これらのことから、pentazocine は他のオピオイド受容体は介さず、sigma-1 受容体を介して、Ang II による心肥大を抑制することを確認した。

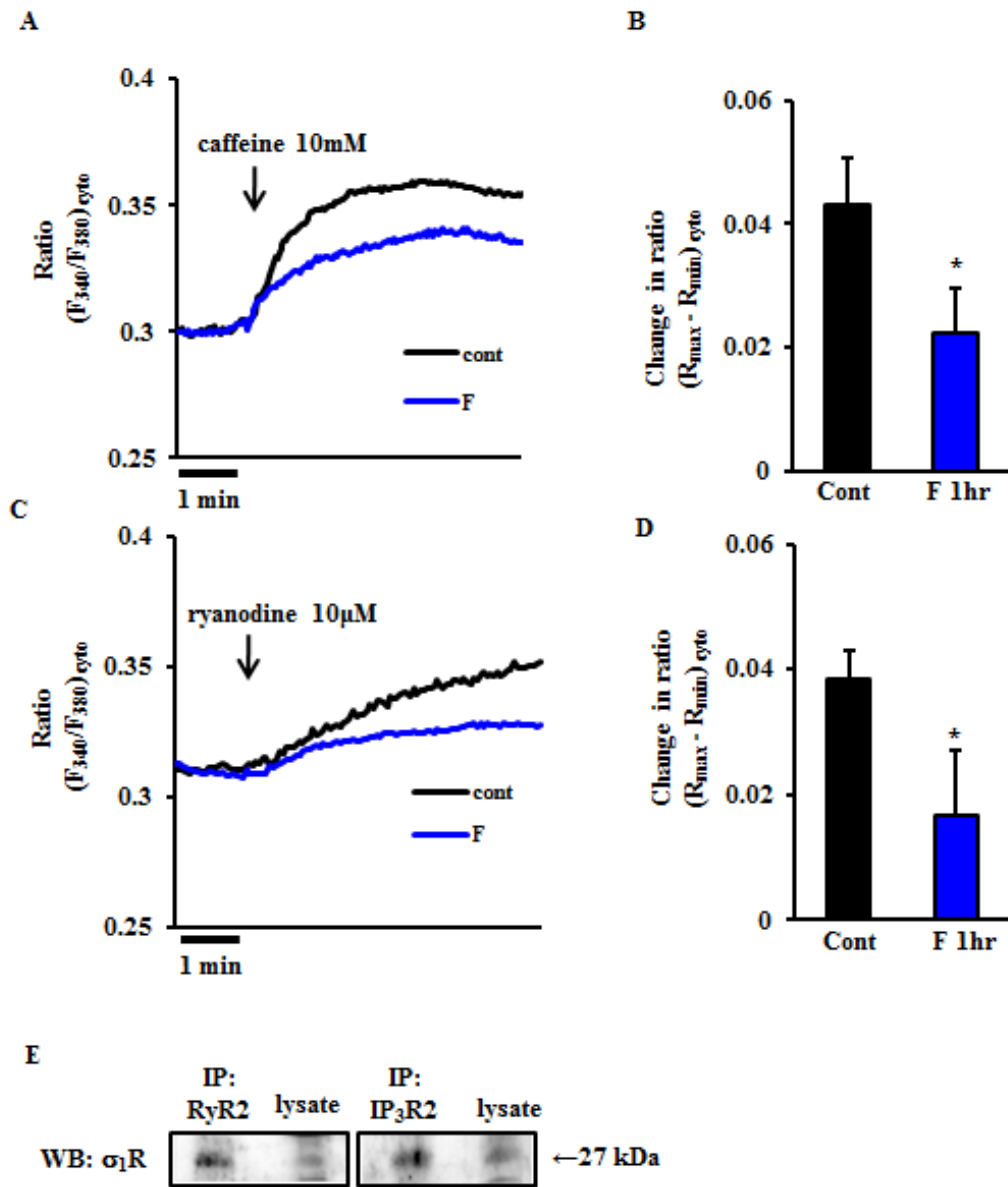


Fig.33. Acute effects of fluvoxamine treatment on caffeine and ryanodine-induced Ca^{2+} release into the cytosol.

(A) Time courses of caffeine-induced Ca^{2+} release to the cytosol. (B) Peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ induced by 10 mM caffeine. (C) Time courses of ryanodine-induced Ca^{2+} release to the cytosol. (D) Peak increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ induced by 10 μM ryanodine. Bar graph data are expressed average of two times assay. Each bar graph consists of greater than 20 cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ versus the control cells. (E) Immunoprecipitation analysis of endogenous σ_1R and RyR using rat heart lysate. After immunoprecipitation with anti-RyR2 antibody or anti-IP₃R2 antibody, immunoprecipitants with heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analysis using anti- σ_1R antibody.

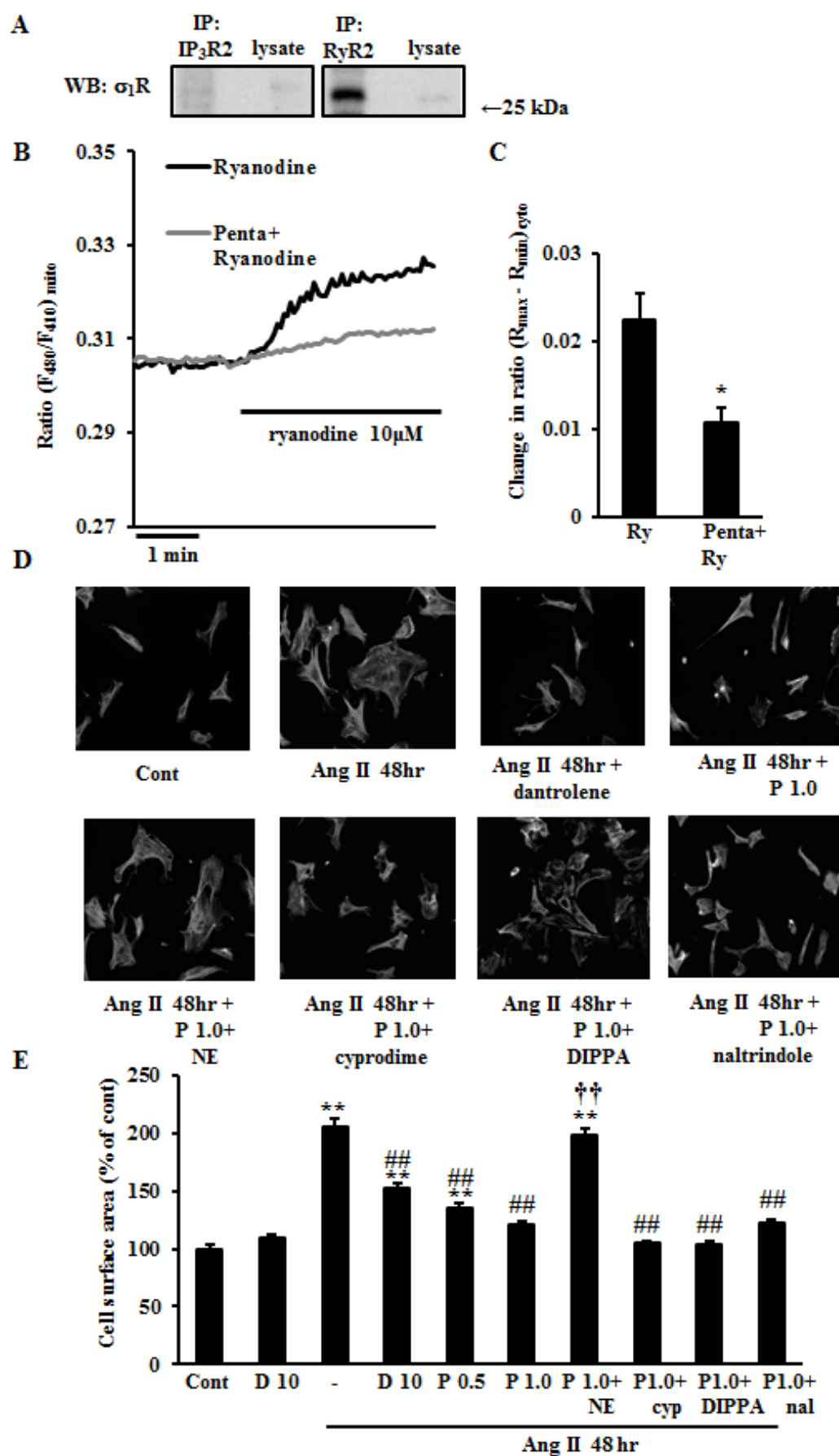


Fig. 34. Effects of pentazocine treatment on Ang II-induced hypertrophy of cultured cardiomyocytes.

A: Immunoprecipitation analyses of σ_1 R with anti-IP₃R2 or anti-RyR2 antibody using neonatal rat cardiomyocyte lysate. After immunoprecipitation with anti-IP₃R2 or anti-RyR2 antibody, immunoprecipitants with heart extracts (lysate) were separated on SDS-PAGE and subjected to western blot analyses using anti- σ_1 R antibody. B: Time courses of ryanodine-induced Ca²⁺ release to the cytosol. C: Peak increases in [Ca²⁺]_{cyto} induced by 10 μ M ryanodine. Each group consists of greater than 10 cells. D: Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Rhodamine-conjugated Phalloidin, and processed for fluorescence microscopy. One hundred cells from randomly selected fields were evaluated in each condition for cell size. E: Cell size is expressed as a percentage of the relative surface area compared to control cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the control cells; ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 1 μ M pentazocine-treated cells. D: dantrolene (10 μ M for 48 hr). NE: NE-100 (10 μ M for 48 hr). cyp: Cyprodine (10 μ M for 48 hr). nal: Naltrindole (10 μ M for 48 hr).

3-2-7. AngII による初代培養心筋細胞肥大反応に対する SA4503 の効果

次に、sigma-1 受容体選択的アゴニストである SA4503 の効果を検討した。SA4503 および NE-100 は、AngII 添加後 48 時間後に添加し 24hr 後に検討した。コントロール群に比較し、100 nM Ang II 暴露により細胞サイズは約 2 倍に増大した ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 35A, B)。SA4503 処置は、濃度依存的に心筋細胞肥大を抑制した ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 35A, B)。NE-100 前処置により、SA4503 の効果は消失した ($P < 0.01$ vs AngII+SA 群; Fig. 35A, B)。また、IP₃ 受容体阻害薬である xestospongine によっても SA4503 の心筋細胞肥大抑制作用は阻害された ($P < 0.01$ vs AngII+SA 群; Fig. 35A, B)。

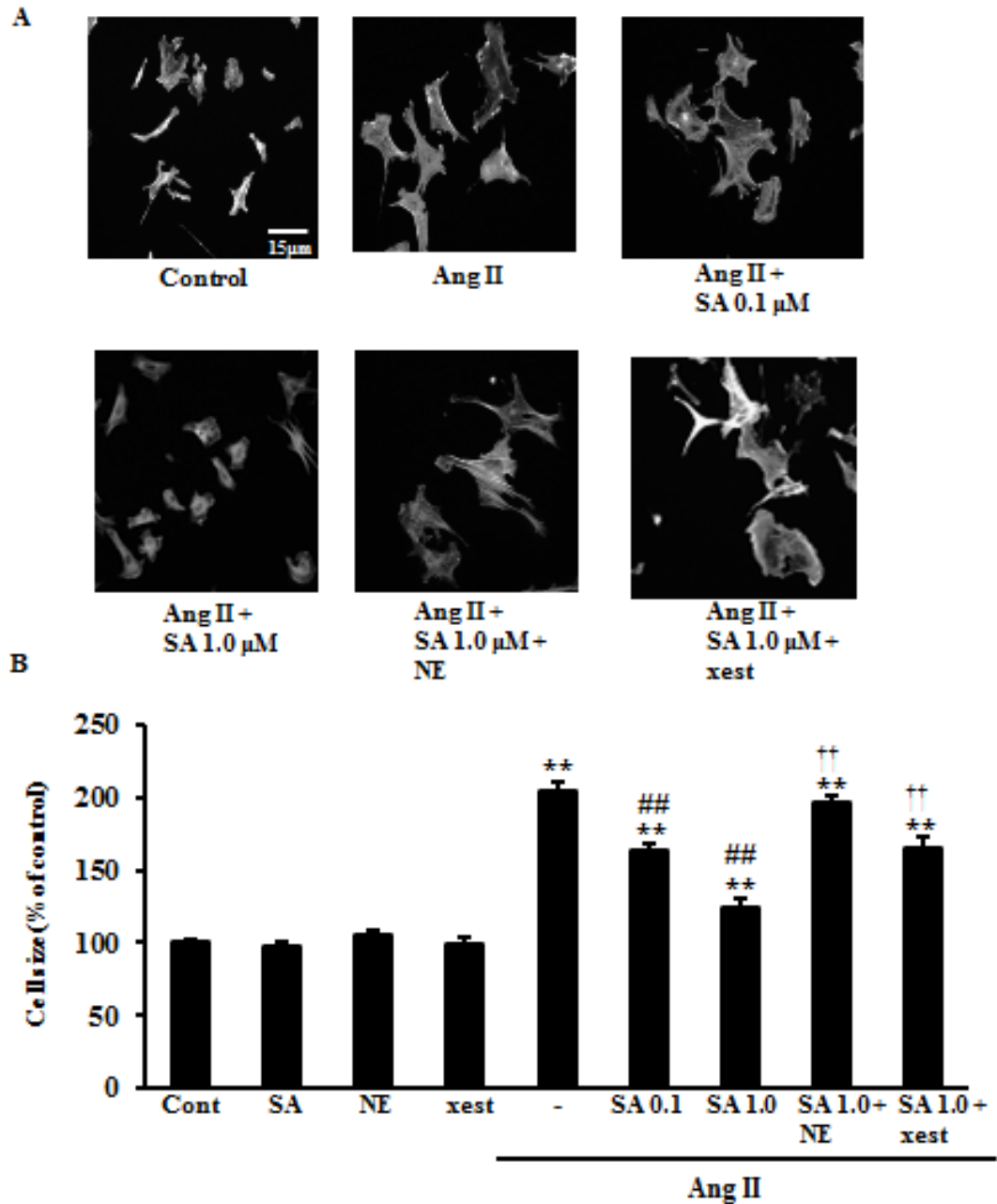


Fig. 35. Effects of SA4503 treatment on Ang II-induced hypertrophy of cultured cardiomyocytes.

A, Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Rhodamine-conjugated Phalloidin, and processed for fluorescence microscopy. One hundred cells from randomly selected fields were evaluated in each condition for cell size. B, Cell size is expressed as a percentage of the relative surface area compared to control cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. **, $P < 0.01$ versus the control cells; ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 1 μ M SA4503-treated cells. NE: NE-100 (10 μ M for 24 hr). Xest: xestospongin C (1 μ M for 24 hr).

3-2-8. 培養心筋細胞におけるミトコンドリア Ca^{2+} 輸送に対する SA4503 の効果

次に、SA4503 でも同様のメカニズムを介して、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送を促進するか検討した。Ang II 72 時間刺激によりミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送は、有意に抑制されたのに対し ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 36A-C)、SA4503 処置によりほぼ完全に改善した ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 36A-C)。次に、 IP_3 受容体を介した細胞質への Ca^{2+} 放出について検討した。Ang II 72 時間刺激により細胞質への Ca^{2+} 放出は、ミトコンドリアと同様に、有意に抑制された ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 36D-F)。一方、SA4503 処置により部分的な改善しか見られなかった ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 36D-F)。

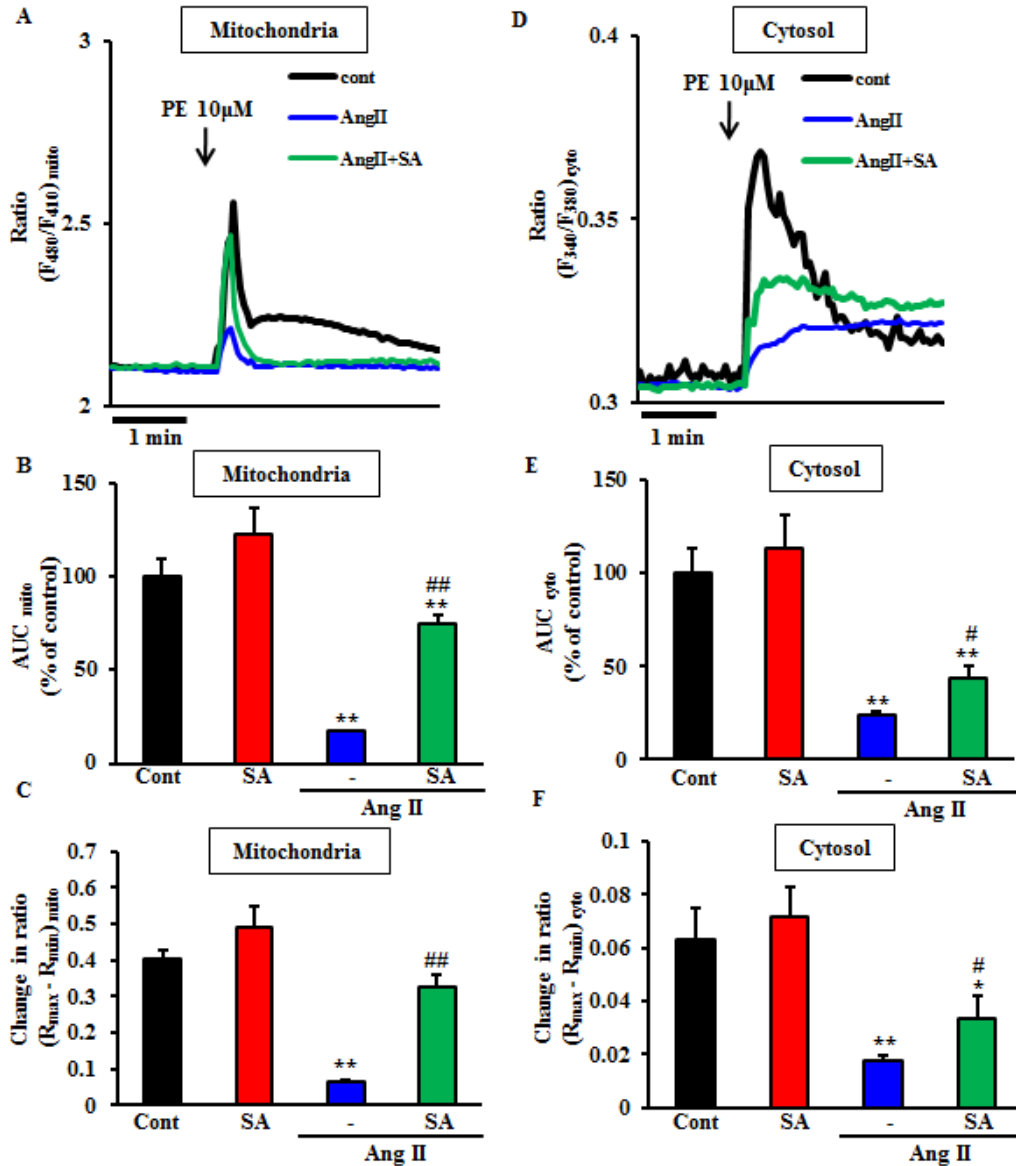


Fig. 36. Effects of SA4503 treatment on PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria and the cytosol.

A, Time courses of PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria 72 hr after 100 nM Ang II treatment with or without SA4503 treatment during the last 24 hr. B, Area under the curve (AUC) quantification of PE-induced Ca^{2+} influx into mitochondria. C, Peak increases in $[Ca^{2+}]_{mito}$ induced by 10 μ M PE. D, Time courses of PE-induced Ca^{2+} release into the cytosol 72 hr after 100 nM Ang II treatment with or without SA4503 treatment for the last 24 hr. E, AUC quantification of PE-induced Ca^{2+} release into the cytosol. F, Peak increases in $[Ca^{2+}]_{cyto}$ induced by 10 μ M PE. Each group consists of more than 10 cells. Data are expressed as percentages of control cells (mean \pm S.E.M.) *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells.

3-2-9. 培養心筋細胞におけるミトコンドリア機能に対する SA4503 の効果

次に、免疫染色法により、sigma-1 受容体の局在 (Fig. 37A: 緑) およびミトコンドリア形態 (Fig. 37A: 赤)について初代培養細胞を用いて検討した。Sigma-1 受容体は、無刺激では細胞質全体に発現する。AngII 72 時間処置により sigma-1 受容体の発現量は細胞全体で減少した。一方、SA4503 処置群では、sigma-1 受容体の発現低下を抑制した。NE-100 同時処置では、SA4503 による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかった。ミトコンドリアの染色には、ミトコンドリア膜電位依存性に取り込まれる MitoTracker Red CMXRos を用いた。ミトコンドリアの形態は、AngII 処置により膜電位が低下し、断片化することが示された。SA4503 処置群では、fluvoxamine と同様に、膜電位の低下が抑制され、またミトコンドリアの断片化は抑制された。NE-100 同時処置では、これらミトコンドリア保護作用は消失した。

さらに、ミトコンドリア機能を検討するため、細胞内 ATP 含有量について検討した。AngII 72 時間暴露により減少した ATP 産生量は ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 38B)、SA4503 処置によりほぼ完全に回復した($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 38B)。また、SA4503 処置による ATP 量改善作用は NE-100、siRNA sigma-1 受容体ノックダウンにより完全に消失した ($P < 0.01$ vs AngII+SA 群; Fig. 37B)。また、IP₃ 受容体阻害薬である xestospongine によっても SA4503 の ATP 量改善作用は消失した ($P < 0.01$ vs AngII+SA 群; Fig. 37B)。さらに、sigma-1 受容体/IP₃ 受容体を介した ATP 産生量を検討するため、IP₃ 産生型の刺激の PE 刺激による ATP 産生量について検討した。PE 刺激による ATP 産生上昇はミトコンドリア内膜に存在する Ca²⁺ ユニporter (MCU) の阻害剤である Ru360 によって抑制されることを確認した (Fig. 37C)。コントロールでは PE 刺激により ATP 産生量は約 180%まで上昇する ($P < 0.01$ vs 未処置群; Fig. 37C)。AngII 暴露により PE 刺激効果は消失する (Fig. 37C)。また、SA4503 処置により、PE 刺激による ATP 産生量は完全に回復した。NE100 処置により fluvoxamine の効果は消失した (Fig. 37C)。これらのことから SA4503 は fluvoxamine 同様、

培養心筋細胞において、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ATP 産生を亢進することが確認できた。

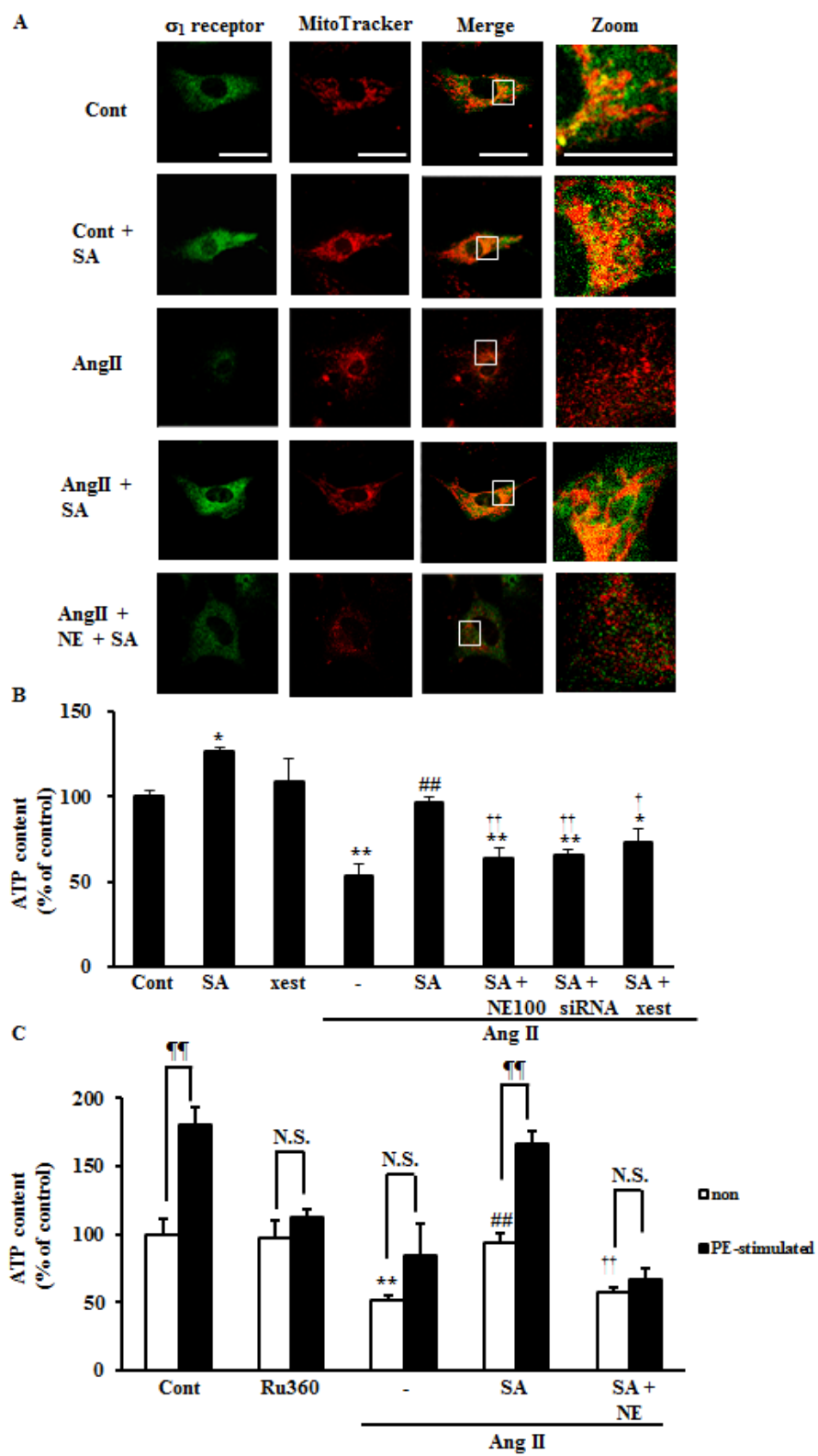


Fig. 37. Intracellular localization of σ_1 R and ATP content following treatment with Ang II and SA4503.

A, Cultured cardiomyocytes were processed using immunofluorescence to mark the σ_1 R (green) and MitoTracker Red CMXRos (red) to mark mitochondria. Scale bar = 8 μ m. B, Measurement of cellular ATP content 72 hr after treatment with 100 nM Ang II with or without SA4503 treatment for the last 24 hr. Each group consists of 4 samples. C, Measurement of cellular ATP content with or without 10 μ M PE stimulation. Each group consists of 4 samples. Data are expressed as percentages of the control cell value (mean \pm S.E.M.) *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 1 μ M SA4503-treated cells; ¶¶, $P < 0.01$ versus the non-stimulated cells. NE: NE-100 (10 μ M for 24 hr). Xest: Xestospongine C (1 μ M for 24 hr).

3-2-10. 培養心筋細胞におけるミトコンドリア機能に対する SA4503 の効果

ミトコンドリア形態についてさらに検討するため、ミトコンドリアに存在するチトクローム c で染色した (Fig. 38A: 赤)。ミトコンドリアの形態は、AngII 曝露群において断片化が誘導された。SA4503 処置では、fluvoxamine と同様に、ミトコンドリアの断片化は抑制された。NE-100 同時処置により、これらミトコンドリア保護作用は消失した。さらに、ミトコンドリア機能調節メカニズムを検討するため、sigma-1 受容体、ミトコンドリアタンパク質である voltage-dependent anion channel (VDAC)、mitofusin 1 (Mfn1)、そして ER-mitochondria 結合タンパク質である mitofusin 2 (Mfn2)、GRP75 について検討した。GRP75 は、ER に存在する IP₃ 受容体とミトコンドリアに存在する VDAC と結合することにより ER とミトコンドリアをつなぐことが報告されている (Szabadkai et al., 2006)。Sigma-1 受容体発現量は、免疫染色法で示唆された通り、AngII 曝露により有意に減少し ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 38B, C)、SA4503 処置では、有意に減少が抑制された ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 38B, C)。NE-100 同時投与群では、SA4503 による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかった。それに伴い、ER-mitochondria 結合タンパク質である GRP75 および Mfn2 は、AngII 曝露群において有意に減少し ($P < 0.01$ vs Control 群; Fig. 38B, C)、SA4503 処置群では、有意に減少が抑制された ($P < 0.01$ vs Ang II 群; Fig. 38B, C)。NE-100 同時投与群では、SA4503 による sigma-1 受容体の発現亢進は阻害されなかったが、GRP75 および Mfn2 の改善作用は消失した。一方、ミトコンドリアタンパク質である VDAC, Mfn1 は変化しない。これらのことから SA4503 によるミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送促進作用は、IP₃ 受容体の直接的機能調節と sigma-1 受容体を介した ER-mitochondria 結合タンパク質発現上昇が間接的に関与すると考えられる。

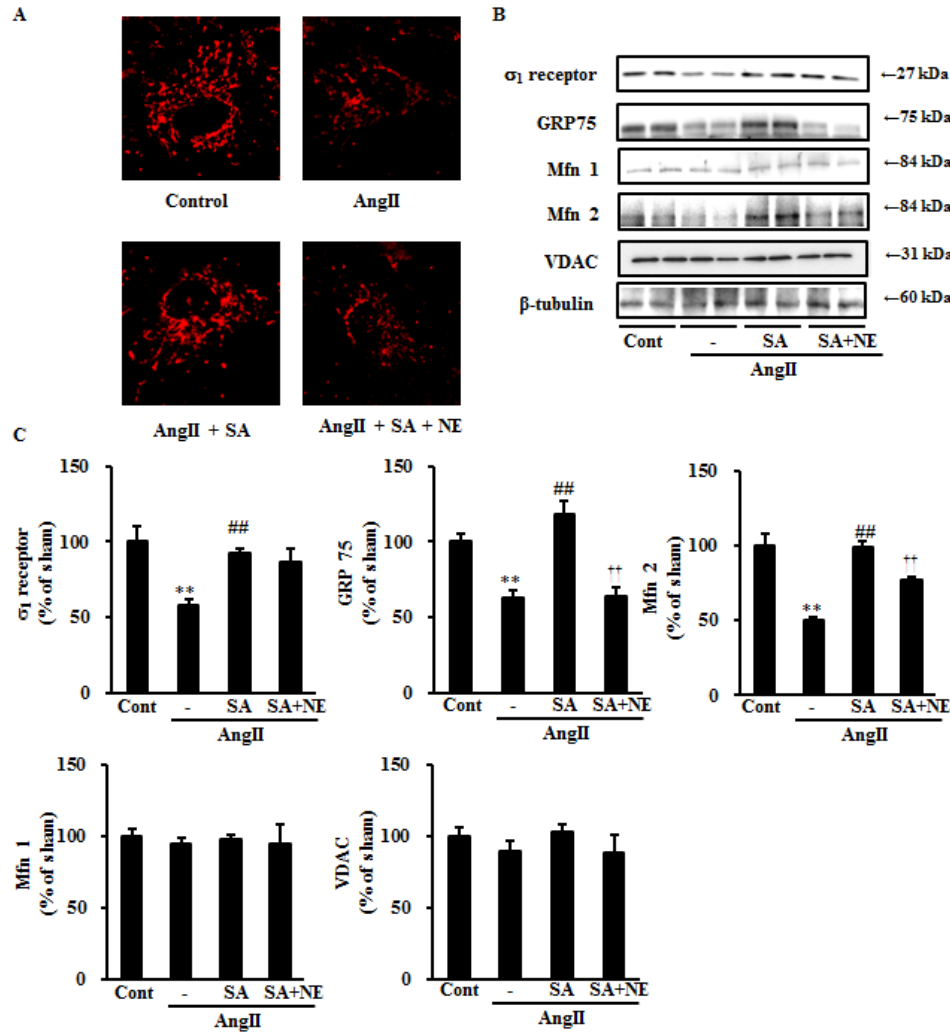


Fig. 38. Effect of SA4503 and NE-100 on expression of σ_1 R and ER-mitochondria junctional proteins.

A, Cultured cardiomyocytes were processed using immunofluorescence to monitor mitochondrial morphology using Cytochrome c (red). Scale bar = 15 μ m. B, Western blot analysis of σ_1 R, VDAC and ER-mitochondria junctional protein expression in neonatal rat ventricular myocytes with or without drug treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading in each lane. C, Densitometric quantification of σ_1 R and VDAC immunoreactive bands. C, Densitometric quantification of ER-mitochondria junctional protein immunoreactive bands. Each group consists of 4 samples. Data are expressed as percentages of control cell values (mean \pm S.E.M.) **, $P < 0.01$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II plus 1 μ M SA4503-treated cells.

3-3. 考察

本研究では、fluvoxamine, pentazocine, SA4503 処置により in vivo において TAC による病的心肥大の抑制効果が直接効果かどうか、培養心筋細胞を用いて明らかにした。また、NE100 と siRNA を用いて、fluvoxamine, pentazocine, SA4503 が sigma-1 受容体を介して心筋肥大を抑制することを示した。Fluvoxamine, SA4503 が AngII による心筋細胞肥大・心筋細胞死を抑制するメカニズムとして、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送促進による ATP 産生の増加および、ryanodine 受容体からの Ca^{2+} 漏出抑制が関与していることを明らかにした。本研究において、SR に存在する sigma-1 受容体を刺激すると、ミトコンドリア形態に影響を及ぼすという興味深い知見を得た (Fig. 37A)。ER-ミトコンドリアの結合タンパク質である GRP75 および Mfn2 の発現量について検討した結果、AngII による病的心肥大・心筋細胞死において減少しており、SA4503 処置すると改善が見られた (Fig. 37B, C)。これらの結果は、SA4503 によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送促進作用は、 IP_3 受容体の直接的機能調節と sigma-1 受容体を介した ER-mitochondria 結合タンパク質発現上昇させることによる間接的機能調節が存在することを示している。しかしながら、SR に存在する sigma-1 受容体が GRP75 や Mfn 2 の発現を調節するメカニズムについては不明な点が多く、今後さらなる検討が必要である。

本研究では、sigma-1 受容体は IP_3 受容体と会合し、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を促進し、ATP 産生を促進していることを心筋細胞において初めて証明した。Ang II 暴露 72 時間後において、 IP_3 受容体発現は増加してくるメカニズムは不明であるが、免疫染色の検討から IP_3 受容体は凝集しており (Fig. 28C)、機能していない IP_3 受容体の分解機構が破綻している可能性が示唆された。ATP 産生促進により、心筋収縮のエネルギーを供給することや、細胞質 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与する SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) の活性化や、細胞質 Ca^{2+} -ATPase (PMCA) の活性化を引き起こすことにより、病的心肥大を抑制すると考えられる。さらに、ryanodine 受容体を介する異常な Ca^{2+} 漏出は CaMKII やカルシニューリンの活性化を引き起こし、病的心肥大を誘導する (Zou et al., 2011; Heinzel et al., 2011)。例

例えば、ryanodine 受容体ヘテロノックアウトマウスでは、TAC による心肥大・心機能障害を抑制することが報告されている (Zou et al., 2011)。また、CaMKII により ryanodine 受容体の Ser2814 がリン酸化されると SR からの Ca^{2+} 漏出が引き起こされることや、TAC による心機能障害が増悪することなどが報告されている (Respress et al., 2012)。実際に ryanodine 受容体の Ser2814 不活化ノックインマウスでは、TAC による心不全が抑制される (Respress et al., 2012)。本研究において sigma-1 受容体は IP_3 受容体だけでなく、SR に存在する ryanodine 受容体と相互作用し、ryanodine 受容体からの異常 Ca^{2+} 漏出を抑制することを明らかとした。しかしながら、その抑制が直接的なものなのか、また、リン酸化の抑制なのか、構造変化なのかは明らかにできなかった。結合サイトを含め、sigma-1 受容体と ryanodine 受容体のさらなる検討が必要であると考えている。また、新生児ラット心筋細胞は成人ラット心筋細胞と T 菅の発達や IP_3 受容体、ryanodine 受容体といった SR Ca^{2+} チャネルの発現バランスが大きく異なる。特に ryanodine 受容体は成人になるにつれ発現量が上昇してくることから、今後は成人ラットの急性単離心筋を用いて検討していく必要があると考えている。

3-4. 小括

本章では、培養心筋細胞を用いて、sigma-1 受容体の細胞機能における役割を追究した。生理的な条件で、培養心筋細胞を sigma-1 受容体アゴニストで長時間処理すると、sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送が促進され、ATP 産生が増強した (Fig. 39)。さらに、IP₃ 受容体に加えて、SR に存在する ryanodine 受容体と複合体を形成し、ryanodine 受容体からの Ca²⁺ 漏出を抑制した。一方、AngII 暴露による、肥大心筋では sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送が抑制され、ATP 産生が減少した。Sigma-1 受容体アゴニストの短時間処理では、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送が促進された。従って、sigma-1 受容体アゴニストにより、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進することにより、ATP 産生を促進する結果心筋細胞障害を抑制することが示唆された。

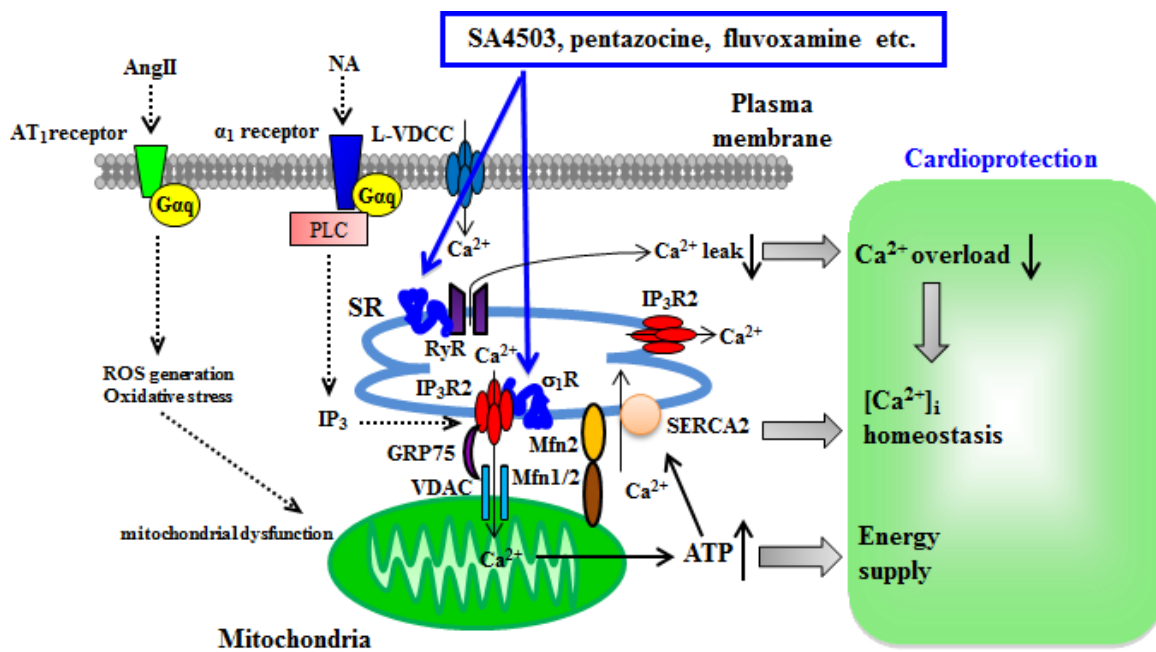


Fig. 39. Schematic representation of the hypothesis tested and results obtained.

Shown is a model of regulation of $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and ATP production by σ_1 R agonist including SA4503, pentazocine and fluvoxamine through σ_1 R stimulation, as suggested by findings presented here. IP_3R2 : IP_3 receptor type 2, VDAC: voltage-dependent anion channel, SERCA: sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

第四章 総括

本研究では、心疾患において sigma-1 受容体発現レベルが低下すること、様々な sigma-1 受容体アゴニストにより sigma-1 受容体の発現レベルが上昇することを証明した。Zamanillo ら (2000) は、ラット脳組織において、sigma-1 受容体のアゴニストである E-5842 の慢性投与により sigma-1 受容体の mRNA レベルが上昇することを報告した。しかし、Shirayama ら (1993) は、ラット脳組織において sigma-1 受容体の低親和性アゴニストである imipramine (Ki: 343 nM) の慢性投与により、sigma-1 受容体の結合サイトが減少することを示した。さらに、sigma-1 受容体アンタゴニストである haroperidol により、sigma-1 受容体の結合サイトが脳で減少することも報告されている (Inoue et al., 2000)。これらの矛盾する結果は、用いた細胞が異なることによると考えられる。心筋細胞では、sigma-1 受容体アンタゴニストである NE100 の慢性投与により、sigma-1 受容体の発現量は変化しなかった (Fig. 5E)。同様に、NE100 は、sigma-1 受容体アゴニストによる左心室心筋細胞における sigma-1 受容体の発現増加を抑制しない。これらの結果から、sigma-1 受容体アゴニストの心肥大抑制作用や Akt シグナルの増強は sigma-1 受容体刺激を介しているが、sigma-1 受容体アゴニストによる sigma-1 受容体の安定化あるいは発現亢進作用は少なくとも NE100 では阻害されない。Sigma-1 受容体アゴニストとアンタゴニストである NE100 は、sigma-1 受容体への結合サイトが異なることが報告されており (Yamamoto et al., 1995)、このことから NE100 は sigma-1 受容体へのアゴニスト結合を阻害し安定化を阻害するのではなく、非競合的に sigma-1 受容体の活性を低下させていると考えられる。また、ラット心臓組織において、sigma-1 受容体のアゴニストである DHEA の慢性投与により sigma-1 受容体の mRNA レベルが上昇することから、転写調節を介した sigma-1 受容体の発現増加が部分的に関与すると考えられる。Sigma-1 受容体の発現量調節のメカニズムについてさらなる検討が必要である。

SSRIs は、様々な生理活性をもつということが分かっている (Golding et al., 2005; Golding et al., 2002; Shoes et al., 2001)。例えば、うつ病ではない患者において SSRIs を処置

すると、ノルエピネフリン濃度低下により交感神経活性が低下する。心理的ストレスは、心拍数や血圧、細胞内カテコラミン濃度が低下するといったことが知られている。さらには、うつ病患者、及び健常者が SSRI を服用すると、血小板機能が低下する (Atar et al., 2006; Pollock et al., 2000; Serebruany et al., 2001; Serebruany et al., 2006)。SSRI を服用している喫煙者の心筋梗塞発症リスクが減少する (Sauer et al., 2001)、さらに、Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial の疫学研究では、プラセボ投与群においては 22.4% 起きていた重度心血管イベントが、sigma-1 受容体アゴニストである sertraline (Ki: 57 nM) 投与群においては、14.5% にまで低下することが示された (Glassman et al., 2005)。同様に、胎児及び新生児における心血管イベントにおける死亡率や再発リスクが、SSRI を服用している患者において低下するという報告もある (Taylar et al., 2005)。しかしながら、SSRI による心疾患リスク減少のメカニズムは明らかとされていなかった。今回、私は SSRI の fluvoxamine は sigma-1 受容体を介して心肥大に伴う心筋障害を減少させるということを初めて証明した。現在の American College of Cardiology/American Heart Association の冠動脈バイパス移植手術、急性心筋梗塞、慢性狭心症ガイドラインは、うつ病の症状の評価をし、うつ病の治療も考慮することを推奨している (Rumsfeld et al., 2005)。将来的にはうつ病と心疾患の関係を明らかにしていくことが必要である。SSRI は、脳内モノアミンの濃度を増加させ、うつ病に関連した生理学的乱れを改善する。それに加え、SSRI による治療は、尿中コルチゾール分泌を正常化し、心拍数変動を改善し、血小板活性を低下させる (Fusch et al., 1985; Glassman et al., 2002; Rumsfeld et al., 2005; Serebruany et al., 2003)。さらに炎症性マーカーの発現を抑制する (Tuglu et al., 2003)。私の研究成果は、SSRI の心筋保護作用の医学的根拠とそのメカニズムを解明した最初の報告であり、臨床的にも、新規心肥大治療薬のターゲットとなりえる可能性を示唆する点で重要な知見である。

Sigma-1 受容体のスプライスバリエントである sigma-1 short 受容体の存在を当研究室は発見した。この sigma-1 short 受容体は sigma-1 受容体/ IP₃ 受容体を介したミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を抑制する (Shioda et al., 2012)。しかし、疾患における sigma-1 short 受容体の機能は不明である。近年、ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送に必須な mitochondrial Ca²⁺

uniporter (MCU) が同定された (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011)。ミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送において重要な役割を果たす sigma-1 受容体研究は、様々な疾患の創薬ターゲットとして今後さらに発展していくと考えられる。実際、本研究で用いた SA4503 は抗うつ薬として第二相臨床試験中である。本研究が、fluvoxamine の適応拡大とさらに心血管イベントを予防する選択的 sigma-1 受容体の開発につながれば有益である。

第五章 方法

本論文中に記載した動物及びその生体試料を用いた実験においては、東北大学実験動物専門委員会の承認を得て、動物実験指針に基づいて実施した。

5.1. Materials

本研究に用いた抗体および試薬は以下のものである。

抗体：anti-sigma-1 receptor antibody (Abcam, Cambridge, UK); anti-eNOS antibody (BD Biosciences, CA, USA); anti-phospho-Akt antibody (Ser⁴³⁷), total-Akt antibody, anti-phospho-Akt antibody (Thr³⁰⁸) and anti-phospho-eNOS antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); anti- β -tubulin antibody (Sigma, MO, USA); anti-eNOS antibody (Sigma, St. Louis, MO); anti-phospho-eNOS antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) antibody (Thr-202/Tyr-204) and total-p44/42 MAPK (ERK 1/2) antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-phospho-PKC α antibody (Ser-657), total- PKC α antibody and anti-heat shock protein-90 antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); anti-Caveolin-3 antibody (BD Biosciences, San Jose, CA); anti- σ_1 receptor antibody (a kind gift of Dr. Teruo Hayashi, National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, (Hayashi et al., 2007)); anti-IP₃ receptor type 2 (American Research Products Inc. Waltham, MA); anti-ryanodine receptor (Abcam, Cambridge, UK); anti-mitofusin 2 (Sigma, St. Louis, MO); anti-mitofusin 1 (Abcam, Cambridge, UK); anti-voltage-dependent anion channel (VDAC) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-GRP75 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-Cytochrome c (BD Biosciences, San Diego, CA); anti-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) (BD Biosciences, CA, USA); anti-rabbit, anti-mouse antibody (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ).

試薬：Sigma-1 受容体選択的アゴニストの SA4503 は、Zhejiang 大学の Zhang 先生により合成された。Sigma-1 受容体選択的アンタゴニストの NE-100 (Santa Cruz, USA)は、Santa Cruz 社から購入した。他の試薬類については、和光純薬株式会社から購入した (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)。

5.2. 実験動物

TAC モデルマウスの作成には、10 週齢雄性 ICR マウスを用いて行った。OVX-PO モデルラットの作成には、6 週齢雌性 wistar ラットを用いて行った。日本 SLC から購入し、 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の一定温度及び、明/暗 24 時間サイクルの部屋において一週間飼育してから用いた。えさ、水は自由に摂取させた。

5.3. TAC モデルマウスの作成

TAC は、Rockman ら (Rockman et al., 1991) の方法に従って行った。Ketamine (100 mg/kg) 及び xylazine (5 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔を行った。37°Cに温めた解剖台に固定し、カニューレで気道を確保し、マウスの呼吸用量である 0.5 ml、110 beats/min の速度で空気を送った。胸部を切開し、第二肋間を開いた。横行大動脈を剥離し、両総頸動脈の間を 27 ゲージのニードルの太さ、およそ 0.04 mm まで 7-0 のシルク糸で狭窄し、心臓に圧負荷をかけた。そののち、胸部をふさぎ麻酔からさめるまで空気、及び体温を保った。Sham 群においては、狭窄はかけずに同様の操作を行った。

5.4. 卵巣摘出圧負荷ラットモデル (OVX-PO) の作成

OVX-PO は、Bhuiyan ら (Bhuiyan et al., 2007) の方法に従って行った。卵巣摘出 (OVX) はペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下で行った。卵巣摘出から 2 週間後に腹部大動脈狭窄を行った。ラットをペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下にて、切開部周囲をイソジンで消毒した後、外科用鋏を用いて正中線と平行に腹部を切開し、腹部大動脈を露出させた。その後、6-0 シルク糸 (ネスコスーチャー滅菌針付き絹製

縫合糸、アズウェル) を用いて左右腎動脈の間の腹部大動脈を 25-gauge の注射針にまで狭窄した。縫合、閉胸した後、個別ゲージにて飼育した。

5.5. 薬物及び溶媒の投与法

Fluvoxamine、paroxetine マレイン酸塩、DHEA は、0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に懸濁した。SA4503 および NE100 は、0.9% 生理食塩水に溶解した。Fluvoxamine、paroxetine マレイン酸塩及び溶媒投与は、TAC、OVX-PO を行ってから 1 日あけ、1 日 1 回 4 週間連続で心機能測定の前日まで経口投与を行った。Pentazocine 及び溶媒投与は、OVX-PO を行ってから 1 日あけ、1 日 1 回 4 週間連続で心機能測定の前日まで腹腔内投与を行った。DHEA は OVX-PO を行ってから 2 週目から、1 日 1 回 2 週間連続で心機能測定の前日まで経口投与した。E2 は OVX-PO を行ってから 2 週目から、オスミックポンプに 0.1 mg/kg /day になるように調整し、心機能測定の前日まで皮下投与した。Sigma-1 受容体高親和性アゴニストである fluvoxamine (K_i : 36nM) の投与量は、臨床投与量である 1 mg/kg 及びその半分量である 0.5 mg/kg とした。Sigma-1 受容体選択的アンタゴニストである NE100 は、そのアンタゴニストとしての作用が十分に発揮される量である 1 mg/kg とし、sigma-1 受容体の関与を検討した。Paroxetine の投与量も、臨床投与量である 0.2 mg/kg 及びその倍量である 0.4 mg/kg とした。Pentazocine においても臨床投与量である 0.5mg/kg 及びその倍量である 1.0 mg/kg とした。

5.6. 心筋肥大の計測

薬物及び溶媒投与 4 週間後に形態学的検討を行った。マウスの体重を測定後、ketamne (100 mg/kg) 及び xylazine (5 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔を行った。麻酔後、速やかに胸部を開口し、心臓 (heart weight: HW) 及び肺 (lung weight: LW) を取り出し重さを測定した。それぞれの測定値を体重 (body weight: BW) で補正した値を心肥大の指標として用いた。

5.7. 心エコー測定法

10MHz の linear transducer (UST-5545, Aloka)を搭載した、心エコー装置 (SSD-6500, Aloka, Tokyo, Japan) を用い、非観血的にエコー測定を行った。この際の麻酔薬には、2.5% avertin を用い、8 μ l/g で腹腔内投与した (Yamaguchi et al., 2003)。エコーの測定は、American Society of Echocardiography ガイドライン (Manning et al., 1994) に従って行った。心機能の指標として用いられている fraction shortening (FS) (%) は、左室拡張末期径 (LVEDD) から左室収縮末期径 (LVESD) を引き、LVEDD で割り%で表したものをを用いた。

$$FS (\%) = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \times 100$$

5.8. 心血行動態測定法

ラット心血行動態の測定は、ポリグラフ (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) およびサーマルレコーダー (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) に繋いだ圧トランスデューサー (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いて行った。この際の麻酔薬には、ペントバルビタール (50mg/kg) を用い、腹腔内投与した。心血行動態については、左心室の拡張期最小圧 (LVEDP) (AP-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、左心室拡張期圧 (LVDP) (AP-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、左心室収縮速度 ($\pm dp/dt$) (EQ-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、抹消血圧 (MABP) (Ap-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、そして心拍数 (HR) (AT-601G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) について検討した。

5.9. 免疫組織染色法

PBS (pH 7.4)、4% formalaldehyde 還流固定後、組織を OCT Compound (Sakura, Torrance, CA, USA) を用いて凍結切片を作成した後、20 μ m 組織切片を作成した。PBS (pH 7.4) で3回洗い、TSA ブロッッキングを行い、anti- σ_1 receptor 抗体 (1:500)、anti-IP3R2 抗体 (1:200)、anti-ryanodine 抗体 (1:200) をTSAに溶かし5日間 4°C で静置した。洗浄後、Alexa 594 (1:500)、Alexa 488 抗体 (1:500) を1% BSAを含むPBSに溶かし24時間4°Cで

静置した。VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入後、解析は共焦点顕微鏡 (TCS SP, Leica Microsystems) を用いて行った。

5.10. マッソントリクローム染色法

心筋組織を固定後、Masson's trichrome stain kit (Sigma, MO, USA) を用い、SIGMA 社のプロトコールに従い染色した。.

5.11. Real-time PCR 解析法

リアルタイム PCR は、48 well PCR プレート (Mini Opicon Real-Time PCR System, Bio-Rad Laboratories) 上で、iQ SYBER Green Supermix 2X (Bio-Rad Laboratories) を用いた。使用したプライマーは以下のとおりである。ANP : sense, 5'-gtccaacacagatctgatgg-3' ; antisense, 5'-gatttggctgttatcttcgg-3'、GAPDH : sense, 5'-agaacatcatccctgcaccc-3' ; antisense, 5'-acattgggggtaggaacac-3'、Sigma-1 receptor: sense, 5'-cacgtggatgggtggagtatg-3' ; antisense, 5'-cttggccaaagaggtaggtg-3'。相対的な遺伝子量は比較 Ct 法により検討し、GAPDH 量を基準とした。全ての産物の純度と特異性は、テンプレートを除く事や、標準的な融解曲線を示すことにより確かめた。

5.12. Western blot 法

TAC、OVX-PO を行ってから4週間後にサンプル採取を行った。ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔を行った後速やかに心臓を取り出し、PBSに浸した。組織を洗った後、2 mmの厚さにスライサー (RBS-2, Zivic-Miller Laboratories, Zelienople, PA) を用いてスライスした。サンプルは、速やかに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。大動脈は脂肪剥離を行い、2 cm間隔に切り、速やかに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。作成したスライスは、細胞抽出液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 50 nM calyculin A, 50 µg/mL leupeptin, 75 µg/mL pepstatin A, 50 µg/mL trypsin inhibitor and 1 mM dithiothreitol) でホモジナイ

ズした。ホモジネートを4°C、15000 x gで30分間遠心分離し、不溶性画分を取り除いた。タンパク質濃度は Bradford の方法に従い測定した後に、サンプルに Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970)を加え、100°Cで3 分間加熱した。タンパク質濃度を調節し、10% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動ゲル (SDS-PAGE ゲル) へのアプライ量を 50 µg/laneとして、ゲル 1 枚あたり80 mA で150 分間 SDS-PAGEを行った。泳動後、PVDF メンブレンに 70 V で120 分間転写を行った。抗体の非特異的結合を防ぐためにスキムミルクを 5 % の濃度で溶解した Tween, Tris-Buffered Saline (TTBS: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20)中にメンブレンを浸し、常温でブロッキング操作を1時間行った。その後、anti-sigma-1 receptor (Abcam, Cambridge, UK); anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS), β -tubulin (Sigma, St. Louis, MO); anti-phospho-eNOS, anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), total-p44/42 MAPK (ERK1/2), anti-phospho-Akt (Ser473), total Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-phospho-Akt (Thr308), anti-phospho-PKC α , anti-heat shock protein (HSP90) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti-caveolin-3 (BD Biosciences, San Jose, CA) の抗体を用いて、4°C、1晩の条件下で一次抗体と反応させた。TTBS 溶液で洗浄後、メンブレンを anti-rabbit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) の二次抗体と常温で60分間反応させた。TTBS 溶液による洗浄後、二次抗体に標識された blot を ECL detection system (GE healthcare) により発光させ、X線フィルム (Fuji Medical X-ray Film, Fuji Film) に感光させることによりバンドの検出を行った。免疫反応物の定量解析は Imagegauss version 3.41 (Fuji Film) を用いた。

5.13. クロスリンキングと免疫沈降法

OVX-PO を行ってから 4 週間後にサンプル採取を行った。ペントバルビタール(50 mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔を行った後速やかに心臓を取り出し、PBS に浸した。組織を洗った後、2 mm の厚さにスライサー (RBS-2, Zivic-Miller Laboratories, Zelienople, PA) を用いてスライスした。サンプルは、速やかに液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。クロスリンクは Hayashi らの方法を用いて行った (Hayashi and Su., 2007)。作成したスライス、細胞抽

出液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2% CHAPS, protease inhibitor) でホモジナイズした。氷冷した PBS に 150 µg/ml になるよう dithiobis (succinimidylpropionate) (DSP) を加え、60 分間静置した。Tris (pH 8.8, final 50 mM) を加え 15 分間静置し反応を停止させ、0.5% Triton X-100 を加えた後、ホモジネートを 4°C、15000 x g で 30 分間遠心分離し、不溶性画分を取り除いた。タンパク質濃度は Bradford の方法に従い測定した後に、免疫沈降法は Shioda ら (Shioda et al., 2012) の方法に従い行った。

5.14. ATP 測定法

TAC、OVX-PO を行ってから 4 週間後にサンプル採取を行った。ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔を行った後速やかに心臓を取り出し、PBS に浸した。組織を洗った後、2 mm の厚さにスライサー (RBS-2, Zivic-Miller Laboratories, Zelienople, PA) を用いてスライスした。サンプルは、速やかに液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。凍結組織を用いて、ATP assay kit (Toyo Ink, Tokyo, Japan) を使い、Toyo Ink 社のプロトコールに従い測定した。

5.15. 新生児ラット心筋細胞の初代培養

生後 1~3 日の新生児 Wistar ラット心筋細胞の培養は、Lu ら (Lu et al., 2007) の方法に従って行った。ラットから心臓を速やかに取り出し、心室を単離し Hank's balanced salt solution (HBSS) (137.0 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 6.12 mM glucose, 4.2 mM NaHCO₃) で洗ったのち、0.1% trypsin 及び 0.05% DNase I を HBSS に溶解させ心筋細胞を単離した。単離終了後、10% fetal bovine serum (FBS) 及び 0.02% trypsin inhibitor を含む DMEM に回収し反応を止めた。4°C, 1000 g, 10 分遠心後、10% FBS を含む DMEM を加え、90-mm culture dish に入れ、37°C, 90 分間インキュベートした。そこから心筋細胞を回収し、1-2 x 10⁶ 細胞/ dish になるように細胞をまき、10% FBS を含む DMEM を入れ、48 時間インキュベートした。AngII 刺激を行う 24 時間前に serum-free DMEM に交換し 100 nM AngII により刺激を行った。

5.16. 薬物及び溶媒の処置法

Fluvoxamine (5 μ M)、paroxetine マレイン酸塩 (5 μ M) および pentazocine (0.5-1 μ M) は、0.1% DMSO 溶液に溶解した。SA4503(0.1-1 μ M) 及び NE100 (10 μ M) は、滅菌水に溶解した。それぞれの薬物及び溶媒処置は、AngII 暴露開始時からサンプル採取時、及び AngII 暴露後 48 時間後からサンプル採取時まで serum free medium に溶解し行った。急性試験においては、1 時間 serum free medium に溶解し行った。

5.17. Small interfering RNA のトランスフェクション法

Sigma-1 受容体の small interfering (si) RNA (sense: 5'-ACACGTGGATGGTGGAGTA-3' and anti-sense: 5'-TACTCCACCATCCACGTGT-3') は、Exigen (Tokyo, Japan) から購入した。トランスフェクションは、Wang ら (Wang et al., 2006) の方法に従って行った。20 μ M sigma-1 受容体 siRNA 5 μ l を 180 μ l opti-MEM (invitrogen) に溶解した。一方で、Lipofectamine 2000 5 μ l を 10 μ l opti-MEM に溶解した。この両溶液を、室温で 5 分間インキュベートした後、混合しさらに 15 分~20 分間インキュベートした。もう一方で、dish の medium を 1 ml の opti-MEM に交換し、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間インキュベートし、800 μ l opti-MEM 及び 200 μ l siRNA 溶液を加え、4 時間 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。その後、10%の FBS を含む DMEM と置換した。

5.18. 培養心筋細胞の形態学的解析

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしたカバーガラスを入れた 12 穴 dish に細胞をまき、培養した。AngII 刺激を行い、その 48 時間後に PBS (pH 7.4) で 3 回洗い、4% formalaldehyde で固定した。0.1% Triton X-100 で膜透過処理を行い、1% BSA を含む PBS で 30 分間ブロッキングを行った。細胞の大きさを検討する為、rhodamine-conjugated phalloidin (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR) を 1% BSA を含む PBS に溶解し、3 時間、室温でインキュベートを行った。解析は、Olympus fluorescence microscope を用い、細胞表面の大きさの定量的解析には、Image J program を用いた。解析は、ランダムに選び、少なくとも 1

群あたり 100 細胞の定量を行った。細胞面積は、コントロールを 100 % とし、その相対値として表した。

5.19. 培養心筋細胞におけるミトコンドリアの形態学的解析法

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしたカバーガラスを入れた 12 穴 dish に細胞をまき、培養した。培養後、0.02 μ M MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) を 20 分間処置し、PBS (pH 7.4) で 3 回洗い、4% formalaldehyde で固定した。解析は、共焦点顕微鏡 (TCS SP, Leica Microsystems) を用いた。

5.20. 免疫細胞染色法

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしたカバーガラスを入れた 12 穴 dish に細胞をまき、培養した。培養後、PBS (pH 7.4) で 3 回洗い、4% formalaldehyde で固定した。固定後、ブロッッキングを行い、anti- σ_1 receptor 抗体 (1:500)、anti-IP3R2 抗体 (1:200) を 1% BSA を含む PBS に溶かし 24 時間 4°C で静置した。洗浄後、Alexa 594 (1:500)、Alexa 488 抗体 (1:500) を 1% BSA を含む PBS に溶かし 24 時間 4°C で静置した。封入後、解析は共焦点顕微鏡 (TCS SP, Leica Microsystems) を用いた。

5.21. TUNEL 染色法

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしたカバーガラスを入れた 12 穴 dish に細胞をまき、培養した。培養後、PBS (pH 7.4) で 3 回洗い、4% formalaldehyde で固定した。固定後、apoptosis detection kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて kit のプロトコールに従い染色した。実験ごとにランダムに選んだ 10 区画の領域から算出した。

5.22 Ca^{2+} imaging 法

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングしたカバーガラスを入れた 12 穴 dish に細胞をまき、培養した。細胞質 Ca^{2+} 動態を測定するために細胞を Krebs' s buffer (135 mM NaCl,

6 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 12 mM glucose, and 12 mM HEPES) を用いて、2.5 μM Fura-2 acetoxymethyl ester (AM) (Sigma-Aldrich) で 30 分間インキュベーションした。その後、10 μM phenylephrine (PE), 10 μM ryanodine , 10 mM caffeine を用いて刺激し、解析した。比率測定は、530nm 蛍光波長における 340nm と 380nm の励起比を 3 秒ごとに計測した。比率の値は、細胞質全体からの蛍光強度の平均により求めた。

ミトコンドリアの Ca²⁺ 動態を測定するために、細胞にミトコンドリア移行性シグナルを持った Ca²⁺ 指示薬発現ベクター((ratiometric-pericam-mt/pcDNA3), which was a kind gift of Dr. Atsushi Miyawaki of the RIKEN Brain Science Institute (Wako-city, Japan)) をトランスフェクションした。トランスフェクション 2 日後に Ang II 刺激を行い、その 48, 72 時間後に 10 μM phenylephrine (PE) を用いて刺激し、解析した。ratiometric-pericam-mt/pcDNA3 を用いた二重励起イメージングは、2 つのフィルターを用いた(EX:482/35, DM:506, EM:536/40 and EX:414/46, DM:510, EM:527/20)。得られた画像は、Metafluor Imaging system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で解析した。

5.23 統計学的処理

全てのデータは、平均値 ± 標準誤差で算出した。統計上有意な差に関しては、ANOVA、post hoc test として Dunnett および、Scheffe's test により検定処理した。また、危険率 5%未満をもって統計上有意差有りと判定した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終止御懇篤なるご指導ならびに御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野 教授 福永浩司先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文を作成するにあたり、共同研究を賜りました東北大学大学院工学研究科・医工学研究科 教授 金井浩先生、同分野 准教授 長谷川英之先生に厚く御礼を申し上げます。

また、有益なる御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野 講師 森口茂樹先生、同分野 助教 塩田倫史先生、実験技術の御指導と御協力を頂きました当研究室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、本論文を御校閲下さいました東北大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野 佐藤博先生、生活習慣病治療薬学分野 平澤典保先生に深く感謝いたします。

参考文献

- Atar D, Malinin A, Takserman A, Pokov A, van Zyl L, Tanguay JF, Lesperance F, Serebruany V. Escitalopram, but not its major metabolites, exhibits antiplatelet activity in humans. *J Clin Psychopharmacol* 26: 172-177, 2006.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476(7360): 341-5, 2011
- Bhuiyan MS, Fukunaga K. Stimulation of sigma-1 receptor by dehydroepiandrosterone ameliorates hypertension-induced kidney hypertrophy in ovariectomized rats. *Exp Biol Med* 235: 356-364, 2010.
- Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1606-E1614, 2007.
- Bhuiyan MS, Tagashira H, Fukunaga K. Dehydroepiandrosterone mediated stimulation of sigma-1 receptor activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Cardiovasc Ther* 29(4): 219-30, 2011a.
- Bhuiyan MS, Tagashira H, Fukunaga K. Sigma-1 receptor stimulation with fluvoxamine activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Eur J Pharmacol*, 650(2-3): 621-8, 2011b.
- Bhuiyan MS, Tagashira H, Shioda N, Fukunaga K. Targeting sigma-1 receptor with fluvoxamine ameliorates pressure-overload-induced hypertrophy and dysfunctions. *Expert Opin Ther Targets* 14(10): 1009-1022, 2010.

- Bhuiyan MS, Shioda N, Shibuya M, Iwabuchi Y, Fukunaga K. Activation of endothelial nitric oxide synthase by a vanadium compound ameliorates pressure overload-induced cardiac injury in ovariectomized rats. *Hypertension* 53(1): 57-63, 2009.
- Carrithers M, Tandon S, Canosa S, Michaud M, Graesser D, Madri JA. Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. *Am J Pathol* 166: 185-196, 2005.
- Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Foscett JK. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*. 142(2), 270-83, 2010
- Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*. 23(5):665-86, 2002
- Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, Gravanis A. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(21):8209-14, 2004
- Chen Y, Liu Y, Dorn GW 2nd, Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res*. 109(12): 1327-31, 2011
- Cooper GL. The safety of fluoxetine: an up-date. *Br J Psychiatry* 153: 77-86, 1988.
- de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456(7222): 605-610, 2008
- Denton R.M., Randle P.J., Martin B.R. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem. J*. 128:161–163, 1972

- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 336-40, 2011
- Dumont M, Lemaire S. Interaction of 1,3-di(2-[5-3H]tolyl) guanidine with sigma 2 binding sites in rat heart membrane preparations. *Eur J Pharmacol* 209: 245-248, 1991.
- Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, Eilam Y. Sigma receptor ligands modulate contractility, Ca⁺⁺ influx and beating rate in cultured cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1300-1309, 1994.
- Ela C, Hasin Y, Eilam Y. Apparent desensitization of a sigma receptor sub-population in neonatal rat cardiac myocytes by pre-treatment with sigma receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 295: 275-280, 1996.
- Fernández-Hernando C, Ackah E, Yu J, Suárez Y, Murata T, Iwakiri Y, Prendergast J, Miao RQ, Birnbaum MJ, Sessa WC.. Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metab* 6(6): 446-57, 2007
- Fialova K, Krizanova O, Jarkovsky J, Novakova M. Apparent desensitization of the effects of sigma receptor ligand haloperidol in isolated rat and guinea pig hearts after chronic treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 1019-1027, 2009.
- Fisch C. Effect of fluoxetine on the electrocardiogram. *J Clin Psychiatry* 46 (suppl 2): 42-44, 1985.
- Forrester AW, Lipsey JR, Teitelbaum ML, DePaulo JR, Andrzejewski PL. Depression following myocardial infarction. *Int J Psychiatry Med.* 22:33-46, 1992
- Frasure-Smith N, Lesperance F, Talajic M. Depression following myocardial infarction: impact on 6-month survival. *JAMA.* 270:1819-1825, 1993
- Fuchs E, Czeh B, Flugge G. Examining novel concepts of the pathophysiology of depression in the chronic psychosocial stress paradigm in tree shrews. *Behav Pharmacol* 15: 315-325, 2004.

Fulton D, Gratton J-P, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299: 818-824, 2001.

Glassman AH, O'Connor CM, Califf RM, Swedberg K, Schwartz P, Bigger JT Jr, Krishnan KR, van Zyl LT, Swenson JR, Finkel MS, Landau C, Shapiro PA, Pepine CJ, Mardekian J, Harrison WM, Barton D, McIvor M; Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHEART) Group. Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. *JAMA* 288: 701-709, 2002.

Golding M, Kotlyar M, Carson SW, Hoyler S, Lazarus C, Davidson C, Guzzo J, Sontz E, Garbutt JC. Effects of paroxetine on cardiovascular response to mental stress in subjects with a history of coronary artery disease and no psychiatric diagnoses. *Psychopharmacology* 182: 321-326, 2005.

Golding M, Kotlyar M, Garbutt JC, Guzzo J, Sontz E, Hinderliter A, Carson SW. Paroxetine modulates psychological and sympathetic responses during public speaking. *J Clin Psychopharmacol* 22: 98-99, 2002.

Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability, *Nat Cell Biol.* 13(5) :589-98, 2011

Hashimoto K. Sigma-1 receptors and selective serotonin reuptake inhibitors: clinical implications of their relationship. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9: 197-204, 2009.

Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrial interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 131(3): 596-610, 2007

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3K-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87: 677-682, 2000.

Heinzel FR, MacQuaide N, Biesmans L, Sipido K. Dyssynchrony of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 50(3): 390-400, 2011.

Hellewell SB, Bruce A, Feinstein G, Orringer J, Williams W, Bowen WD. Rat liver and kidney contain high densities of sigma-1 and σ_2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol* 268: 9-18, 1994.

Inoue A, Sugita S, Shoji H, Ichimoto H, Hide I, Nakata Y. Repeated haloperidol treatment decreases σ (1) receptor binding but does not affect its mRNA levels in the guinea pig or rat brain. *Eur J Pharmacol* 401: 307-316, 2000.

Ishikawa M, Ishiwata K, Ishii K, Kimura Y, Sakata M, Naganawa M, Oda K, Miyatake R, Fujisaki M, Shimizu E, Shirayama Y, Iyo M, Hashimoto K. High occupancy of sigma-1 receptors in the human brain after single oral administration of fluvoxamine: a positron emission tomography study using [¹¹C]SA4503. *Biol Psychiatry* 62: 878-883, 2007.

Lu YM, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Kasahara J, Shirasaki Y, Qin ZH, Fukunaga K. Imbalance between CaM kinase II and calcineurin activities impairs caffeine-induced calcium release in hypertrophic cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 74: 1727-1737, 2007

Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS. In vivo assessment of LV mass in mice using high-frequency cardiac ultrasound: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H1672-1675, 1994.

Matsuno K, Nakazawa M, Okamoto K, Kawashima Y, Mita S. Binding properties of SA4503, a novel and selective sigma 1 receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 306(1-3): 271-9, 1996

Maurice T, Gregoire C, Espallergues J. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory signal (sigma 1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection.

Pharmacol Biochem Behav 84: 581-597, 2006.

McCormack J.G., Denton R.M. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 180: 533–544, 1979

Monassier L, Manoury B, Bellocq C, Weissenburger J, Greney H, Zimmermann D, Ehrhardt JD, Jaillon P, Baro I, Bousquet P. Sigma(2)-receptor ligand-mediated inhibition of inwardly rectifying K(+) channels in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 341-350, 2007.

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6), 3197-202. 2001

Nakano M, Osada K, Misonoo A, Fujiwara K, Takahashi M, Ogawa Y, Haga T, Kanai S, Tanaka D, Sasuga Y, Yanagida T, Asakura M, Yamaguchi N. Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser 473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. *Life Sci* 2009 doi:10.1016/j.lfs.2009.11.017.

Nakayama H, Boli I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkenstein JD. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res* 107(5): 659-666, 2010

Narita N, Hashimoto K, Tomitaka S, Minoabe Y. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 307: 117-119, 1996.

Novakova M, Bruderova V, Sulova Z, Kopacek J, Lacinova L, Kvetnansky R, Vasku A, Kaplan P, Krizanova O, Jurkovicova D. Modulation of expression of the sigma receptors in the heart of rat and mouse in normal and pathological conditions. *Gen Physiol Biophys* 26(2): 110-117, 2007.

- Novakova M, Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, Eilam Y. Inotropic action of sigma receptor ligands in isolated cardiac myocytes from adult rats. *Eur J Pharmacol* 286: 19-30, 1995.
- Novakova M, Ela C, Bowen WD, Hasin Y, Eilam Y. Highly selective sigma receptor ligands elevate inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 353: 315-327, 1998.
- Okuyama S, Imagawa Y, Ogawa S, Araki H, Ajima A, Tanaka M, Muramatsu M, Nakazato A, Yamaguchi K, Yoshida M, et al. NE-100, a novel sigma receptor ligand: in vivo tests. *Life Sci*. 53(18): PL285-90, 1993
- Park CH, Kim YS, Kim YH, Choi MY, Yoo JM, Kang SS, Choi WS, Cho GJ. Calcineurin mediates akt dephosphorylation in the ischemic rat retina. *Brain Res*. 1234:148-157, 2008
- Pollock BG, Laghrissi-Thode F, Wagner WR. Evaluation of platelet activation in depressed patients with ischemic heart disease after paroxetine or nortriptyline treatment. *J Clin Psychopharmacol* 20: 137-140, 2000.
- Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res* 110(11):1474-83, 2012
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8277-8281, 1991.
- Rumsfeld JS, Ho PM. Depression and Cardiovascular Disease: A Call For Recognition. *Circulation* 111(3): 250-253, 2005.

Sauer WH, Berlin JA, Kimmel SE. Selective serotonin reuptake inhibitors and myocardial infarction. *Circulation* 104: 1894-1898, 2001.

Schleifer SJ, Macari-Hinson MM, Coyle DA, Slater WR, Kahn M, Gorlin R, Zucker HD. The nature and course of depression following myocardial infarction. *Arch Intern Med*.149:1785-1789, 1989

Schmidt A, Lebel L, Koe BK, Seeger T, Heym J. Sertraline potently displaces (+)-[3H]3-PPP binding to sigma sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 165: 335-336, 1989.

Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, Nemeroff CB, Musselman DL, van Zyl LT, Finkel MS, Krishnan KR, Gaffney M, Harrison W, Califf RM, O'Connor CM; Sertraline AntiDepressant Heart Attack Randomized Trial Study Group. Platelet/endothelial biomarkers in depressed patients treated with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events: the Sertraline AntiDepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Platelet Substudy. *Circulation* 108: 939-944, 2003.

Serebruany VL, Gurbel PA, O'Connor CM. Platelet inhibition by sertraline and N-desmethylsertraline: a possible missing link between depression, coronary events, and mortality benefits of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Res* 43: 453-462, 2001.

Serebruany VL. Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something? *Am J Med* 119: 113-116, 2006.

Shioda N, Ishikawa K, Tagashira H, Ishizuka T, Yawo H, Fukunaga K, Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, sigma-1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J Biol Chem*. 287(28): 23318-31, 2012

Shirayama Y, Nishikawa T, Umino A, Takahashi K. p-Chlophenylalaninereversible reduction of σ binding sites by chronic imipramine treatment in rat brain. *Eur J Pharmacol* 237: 117-126, 1993.

Shores MM, Pascualy M, Lewis NL, Flatness D, Veith RC. Short-term sertraline treatment suppresses sympathetic nervous system activity in healthy human subjects.

Psychoneuroendocrinology 26: 433-439, 2001.

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms.

Endocrinol 144: 3449-3455, 2003.

Spruce BA, Campbell LA, McTavish N, Cooper MA, Appleyard MV, O'Neill M, Howie J, Samson J, Watt S, Murray K, McLean D, Leslie NR, Safrany ST, Ferguson MJ, Peters JA, Prescott AR, Box G, Hayes A, Nutley B, Raynaud F, Downes CP, Lambert JJ, Thompson AM, Eccles S. Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 64(14): 4875-4886, 2004.

Swenson JR, O'Connor CM, Barton D, Van Zyl LT, Swedberg K, Forman LM, Gaffney M, Glassman AH. Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Group. Influence of depression and effect of treatment with sertraline on quality of life after hospitalization for acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 92: 1271-1276, 2003.

Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R, Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 175(6) :901-11, 2006

Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, Hasegawa H, Kanai H, Fukunaga K. Sigma1-receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(5):H1535-1545, 2010

Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Distinct cardioprotective effects of 17beta-estradiol and dehydroepiandrosterone on pressure-overload-induced hypertrophy in

ovariectomized female rats. *Menopause*. 18(12): 1317-26, 2011

Tagashira H, Bhyuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ_1 -receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.*, 2013a [Accepted manuscript]

Tagashira H, Bhyuiyan MS, Fukunaga K. Diverse regulation of IP₃ and ryanodine receptors by pentazocine through σ_1 -receptor in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305(8): H1201-12, 2013b

Tagashira H, Zhang C, Lu YM, Hasegawa H, Kanai H, Han F, Fukunaga K. Stimulation of $\sigma(1)$ -receptor restores abnormal mitochondrial Ca(2+) mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta*. 1830(4): 3082-94, 2013c

Tanaka M, Shirasaki T, Kaku S, Muramatsu M, Otomo S. Characteristics of binding of [3H]NE-100, a novel sigma-receptor ligand, to guinea-pig brain membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 351(3): 244-51, 1995.

Taylor CB, Youngblood ME, Catellier D, Veith RC, Carney RM, Burg MM, Kaufmann PG, Shuster J, Mellman T, Blumenthal JA, Krishnan R, Jaffe AS; ENRICHD Investigators. Effects of antidepressant medication on morbidity and mortality in depressed patients after myocardial infarction. *Arch Gen Psychiatry* 62(7):792-798, 2005.

Tuglu C, Kara SH, Caliyurt O, Vardar E, Abay E. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 429-433, 2003.

Wang L, Duncan G. Silencing of sigma-1 receptor induces cell death in human lens cells. *Exp Cell Res* 312(8): 1439-1446, 2006.

Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Watanabe T, Asahi M, Taniike M, Matsumura Y, Tsujimoto I, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Nishida K, Ichijo H, Hori M, Otsu K. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(26): 15883-15888, 2003.

Yamamoto H, Miura R, Yamamoto T, Shinohara K, Watanabe M, Okuyama S, Nakazato A, Nukada T. Amino acid residues in the transmembrane domain of the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *FEBS Lett* 445(1): 19-22, 1999.

Zamanillo D, Andreu F, Ovalle S, Perez MP, Romero G, Farre AJ, Guitart X. Up-regulation of sigma (1) receptor mRNA in rat brain by a putative atypical antipsychotic and sigma receptor ligand. *Neurosci Lett* 282: 169-172, 2000.

Zeng G, Nystrom Fh, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101: 1539-1545, 2000.

Zou Y, Liang Y, Gong H, Zhou N, Ma H, Guan A, Sun A, Wang P, Niu Y, Jiang H, Takano H, Toko H, Yao A, Takeshima H, Akazawa H, Shiojima I, Wang Y, Komuro I, Ge J. Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 58(6): 1099-1110, 2011.

発表論文リスト

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

1. **Tagashira H**, Bhyuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K.
Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca^{2+} transport and ATP production through σ_1 -receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.*, 95(2): 89-100, 2014
2. **Tagashira H**, Bhyuiyan MS, Fukunaga K.
Diverse regulation of IP_3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ_1 -receptor in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305(8): H1201-12, 2013
3. **Tagashira H**, Zhang C, Lu YM, Hasegawa H, Kanai H, Han F, Fukunaga K.
Stimulation of $\sigma(1)$ -receptor restores abnormal mitochondrial $\text{Ca}(2+)$ mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1830(4): 3082-94, 2013
4. **Tagashira H**, Bhyuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K.
Distinct cardioprotective effects of 17beta-estradiol and dehydroepiandrosterone on pressure-overload-induced hypertrophy in ovariectomized female rats. *Menopause.* 18(12): 1317-26, 2011
5. **Tagashira H**, Bhyuiyan MS, Shioda N, Hasegawa H, Kanai H, Fukunaga K. Sigma1-receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(5): H1535-45, 2010